

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Kamila Lorene Soares Rocha

**ORTHOPOXVÍRUS VACCÍNIA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS
GERAIS: avaliação da circulação e medidas para minimizar o seu impacto na economia
leiteira da região**

Belo Horizonte
2024

Kamila Lorene Soares Rocha

**ORTHOPOXVÍRUS VACCÍNIA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS
GERAIS: avaliação da circulação e medidas para minimizar o seu impacto na economia
leiteira da região**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Coorientador: Dr. Danilo Bretas de Oliveira

Belo Horizonte

2024

043

Rocha, Kamila Lorene Soares.

Orthopoxvírus vaccínia na região norte do Estado de Minas Gerais: avaliação da circulação e medidas para minimizar o seu impacto na economia leiteira da região [manuscrito] / Kamila Lorene Soares Rocha. – 2024.

159 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade Coorientador: Dr. Danilo Bretas de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vaccinia virus. 3. Infecções por Poxviridae. 4. Biologia Molecular. 5. Sorologia. 6. Queijo. I. Trindade, Giliane de Souza. II. Oliveira, Danilo Bretas de. III. Universidade Federal e Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **KAMILA LORENE SOARES ROCHA**

Nº REGISTRO: 2020713122

Às 14:00 horas do dia **10 de junho de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Elisabeth Neumann (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Isabel Guedes (Escola de Veterinária/UFMG), Pedro Augusto Alves (Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz), Galileu Barbosa Costa (Laboratory of Molecular Virology/Center for Biological Evaluation Research U.S. Food and Drug Administration), Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade (Orientadora) e Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira (Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM) (Coorientador) para julgar o trabalho final "**ORTHOPOXVIRUS VACCÍNIA NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS: AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO E MEDIDAS PARA MINIMIZAR O SEU IMPACTO NA ECONOMIA LEITEIRA DA REGIÃO**" da aluna **Kamila Lorene Soares Rocha**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 10 de junho de 2024

Membros da Banca:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann
Profa. Dra. Maria Isabel Guedes
Prof. Dr. Pedro Augusto Alves
Dr. Galileu Barbosa Costa

De acordo:

Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

(Orientador)
Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira
(Coorientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos
(Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 13/06/2024, às 09:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Galileu Barbosa Costa, Usuário Externo, em 13/06/2024, às 09:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior, em 13/06/2024, às 09:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Giliane de Souza Trindade, Professora do Magistério Superior, em 13/06/2024, às 10:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Pedro Augusto Alves, Usuário Externo, em 13/06/2024, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes, Professora do Magistério Superior, em 13/06/2024, às 11:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unmg.br/sei/controlador_documento.php?acao=documento_conferir&id_organ_acesso_externo=0, informando o código verificador 3257296 e o código CRC BC7A125C.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, pelo Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo.

Agradeço imensamente a minha família, os meus pais Gilvânia e Dilceu por serem a minha base, meu alicerce. Por acreditar na minha capacidade, isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer tudo da melhor maneira que eu puder. Obrigada pelo amor incondicional! Ao meu irmão Diego por todo apoio, amor e alegria que sempre me deu, eu sei que onde estiver, estará sempre torcendo pelo meu sucesso e me abençoando com a sua luz. Muito obrigada, amo vocês!

A minha orientadora e o meu coorientador, os professores Giliane Trindade e o professor Danilo Bretas, por ter acreditado em mim, por toda paciência e ensinamentos ao longo dessa jornada. Aos colegas de laboratório e amigos do Ladip e Ecovir, Mariana, Juliane, Iago, Ana Gabriela, Débora, Carolina, Iara, Vincenzo, Gabriela. As minhas amigas de república por toda amizade e apoio que levarei para a vida Bárbara, Taynara e Stéfany. A Cíntia por todos os momentos e “perrengues” que passamos juntas. Aos amigos que mesmo de longe sempre estiveram presente e me incentivaram, Rayama, Bruna, Elaine, Mayra, Nayara, Vanilde e a todos que fizeram parte desta jornada. Agradeço imensamente a todos, sem cada um de vocês este trabalho não seria possível.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pois sem o financiamento realizado este trabalho não seria possível.

RESUMO

O vírus vaccínia (VACV) pertence ao gênero *Orthopoxvirus* e à família *Poxviridae*. A família *Poxviridae* é composta por vírus geneticamente e morfolologicamente complexos, capazes de infectar um amplo espectro de hospedeiros domésticos e silvestres. O VACV é o agente etiológico da vaccínia bovina (VB), caracterizada como uma zoonose ocupacional. Esta zoonose acomete bovinos, ocasionando lesões comumente observadas nos tetos e úberes. Devido a localização das lesões, o VACV é disseminado principalmente durante o processo de ordenha, sendo ele manual ou mecânico. Estudos têm buscado correlacionar características ambientais de fazendas leiteiras e práticas de manejo ao risco de exposição de vacas leiteiras ao VACV. Isso porque, têm sido constatadas a circulação silenciosa do vírus em propriedades, mesmo sem a presença de sinais clínicos nos animais. Nos humanos, além de sintomas sistêmicos, o VACV causa lesões vesículo-pustulares geralmente encontradas nas mãos e dedos. Essa infecção ocorre geralmente após contato direto com gado leiteiro infectado, ou através de vias alternativas de exposição como contato com leite cru na produção de queijo e até mesmo o consumo destes produtos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a circulação do VACV na bacia leiteira do Serro, considerada uma das mais importantes do estado e subsidiar os produtores rurais quanto ao fluxo da produção de laticínios na ausência e presença de surtos. Além disso, avaliamos a circulação do VACV em primatas não humanos na região norte do estado de Minas Gerais, buscando mapear a circulação desse vírus neste grupo de animais silvestres. Deste modo, a primeira parte do estudo foi conduzida, em quatro propriedades rurais do município do Serro, produtoras de queijo artesanal, apresentando uma delas histórico de surto prévio de VB. Questionários semiestruturados foram aplicados para a verificação de possíveis fatores que podem favorecer a exposição ao VACV na cadeia produtiva do leite e queijo artesanal, realizando a investigação de toda a cadeia do queijo, com posterior acompanhamento destas etapas para, a partir de então, sugerir melhorias metodológicas durante o manejo animal através de palestras, distribuição de material educativo aos produtores participantes do projeto. Em nosso estudo foi possível observar uma soroprevalência para OPXV de 71,42% em indivíduos não vacinados para a varíola demonstrando que em ambientes rurais de áreas endêmicas, os indivíduos são expostos ao VACV por vias alternativas e não só através do contato direto com bovinos infectados. Em relação às análises de queijo, leite e fezes dos bovinos e equinos realizados no estudo, estas apresentaram resultados negativos para a detecção de VACV através da técnica de PCR em tempo real, demonstrando assim que, durante a condução do estudo, as propriedades não

apresentavam a circulação ativa do VACV. A ausência de lesões visíveis nos bovinos também corrobora com tais resultados. Contudo, em todos os grupos de animais domésticos analisados foram encontrados altos índices de positividade para anticorpos neutralizantes anti-OPXV, sendo 80% nos cães, 97,89% nos bovinos e 100% nos equídeos, indicando uma circulação silenciosa pregressa. No que tange a circulação do VACV em primatas não humanos da região norte do estado, foram avaliados 51 primatas neotropicais pertencentes a três espécies em 11 municípios. Dois animais pertencentes ao grupo amostrado apresentaram soropositividade para OPXV com base na técnica de PRNT, demonstrando a exposição prévia ao vírus. Compreendendo melhor a circulação do VACV assim como suas possíveis rotas de infecção, visamos minimizar o impacto do vírus VACV na economia leiteira da região do Serro, através da difusão de conhecimento sobre o vírus, e boas práticas no fluxo da produção dos laticínios, desde a ordenha até o produto para que dessa forma, possamos reduzir o risco de disseminação do vírus via consumo de leite e queijo crus.

Palavras-chave: vírus vaccínia; ortopoxvírus; vaccínia bovina; biologia molecular; sorologia; queijo artesanal.

ABSTRACT

Vaccinia virus (VACV) belongs to the genus *Orthopoxvirus* and the *Poxviridae* family. The *Poxviridae* family has a virus genetically and morphologically complex, able to infect a wide spectrum of domestic and wild hosts. VACV is the etiological agent of bovine vaccinia (VB), characterized as an occupational zoonosis. This zoonosis affects cattle, causing lesions commonly seen on teats and udders. Due to the location of the lesions, VACV mainly spreads during the milking process, whether manual or mechanical. Studies have sought to correlate environmental characteristics of dairy farms and management practices with the risk of exposure of dairy cows to VACV. The silent circulation virus in rural properties has been observed, even without the presence of clinical signs in animals. In addition, in humans, beyond the systemic symptoms, VACV causes vesicular-pustular lesions generally found on the hands and fingers. This infection usually happens after direct contact with infected dairy cattle, or through alternative routes of exposure such as contact with raw milk in cheese production and even consumption of these products. In this way, the objective of this study was to evaluate the circulation of VACV in the Serro region, considered one of the most important cheese producers in the state, and to provide support to rural producers regarding the flow of dairy production in the absence and presence of outbreaks. Furthermore, was evaluated the circulation of VACV in non-human primates in Minas Gerais state in northern region, aiming to map the virus circulation in this wild animals group. The first study part was accomplished on four rural properties in the Serro's region, producers of artisanal cheese, one of which had a history of a VB outbreak previously. Semi-structured questionnaires were applied to verify possible factors that may favor exposure to VACV in the milk and artisanal cheese production. From this, research was carried out the investigation of the entire cheese chain, with subsequent monitoring of these stages, so that from then on, suggest methodological improvements during animal management through lectures and distribution of educational material to producers participating in the project. In this study, it was possible to observe a seroprevalence for OPXV of 71.42% in individuals not vaccinated for smallpox, demonstrating that in rural environments in endemic areas, individuals are exposed to VACV through alternative routes and not only through direct contact with infected cattle. In addition, in relation to the analyzes of cheese, milk and feces of cattle and horses carried out in the study, these presented negative results for the detection of VACV through the real-time PCR technique, thus demonstrating that, during the study, the rural Properties did not present the active circulation of VACV. Moreover, the visible lesions absence in cattle also corroborates these results. However, in all groups of

domestic animals analyzed, high levels of positivity for anti-OPXV neutralizing antibodies were found, 80% in dogs, 97.89% in cattle and 100% in horses, indicating a previous silent circulation. Regarding the VACV circulation in non-human primates in the northern region of the state, 51 neotropical primates belonging to three species were evaluated in 11 counties. As a result, two animals belonging to the sampled group showed seropositivity for OPXV based on the PRNT technique, demonstrating previous exposure to the virus. In conclusion, by better understanding the VACV circulation as well as its possible infection routes, is target to minimize the VACV virus impact on the dairy economy in Serro region, through the knowledge dissemination about the virus, and good practices in the dairy flow production, from milking until the final product. In this way, it would be possible to reduce the risk of virus spreading through the raw milk and cheese consumption.

Key words: vaccinia virus; orthopoxvirus; bovine vaccinia; serology; molecular biology; artisanal cheese.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Inter-relação entre os ambientes.....	18
Figura 2 – Fatores que aumentam a ocorrência de zoonoses	19
Figura 3 – Transbordamento zoonótico.....	20
Figura 4 – Diagrama Filogenético	23
Figura 5 – Morfologia da partícula do VACV	25
Figura 6 – Representação esquemática do genoma dos poxvírus	26
Figura 7 – Ciclo de multiplicação dos poxvírus	28
Figura 8 – Modelo esquemático do curso da infecção de alguns OPXV	30
Figura 9 – Distribuição do VACV na América do Sul.....	31
Figura 10 – Classificação filogenética do VACV baseado no gene A56R	35
Figura 11 – Lesões causadas pelo VACV em humanos.....	37
Figura 12 – Lesões causadas pelo VACV em bovinos.....	38
Figura 13 – Rotas hipotéticas e reportadas de transmissão do VACV	43
Figura 14 – Linha do tempo identificando novos hospedeiros do VACV no Brasil.....	45
Figura 15 – Mapa da produção leiteira do estado de Minas Gerais	48
Figura 16 – Instrumentos utilizados para fabricação de queijo minas artesanais.....	50
Figura 17 – Atuais Regiões Produtoras de Queijo Minas Artesanal	51
Figura 18 – Municípios produtores de queijo pertencentes a microrregião do Serro	53
Figura 19 – Mapa das áreas de estudo do trabalho.....	64
Figura 20 – Imagem do processo de ordenha realizado na fazenda Maravilha.....	74
Figura 21 – Fotografias da fazenda Maravilha.....	75
Figura 22 – Coleta de soro realizada durante a condução do estudo na fazenda Amilton	77
Figura 23 – Fotografias da fazenda Amilton.....	78
Figura 24 – Certificado de premiação medalha de ouro QMA Bom Sucesso.....	79
Figura 25 – Animais se alimentando do soro residual da produção de QMA na fazenda Bom Sucesso	80
Figura 26 – Imagens da fazenda Bom Sucesso	81
Figura 27 – Imagens da fazenda Ferreira Campos	83
Figura 28 – Coleta de amostras do estudo.....	85
Figura 29 – Teste de qPCR para os alvos VGF e HA utilizando DNA extraído.....	86
Figura 30 – Teste de qPCR para os alvos VGF em amostras de soros diluídos dez vezes	86
Figura 31 – Coleta de amostras do estudo.....	87

Figura 32 – Padronização da extração de fezes por dois métodos distintos.....	87
Figura 33 – Amplificação do gene VGF em amostras de fezes bovinas.....	88
Figura 34 – Possíveis rotas de infecção/exposição pelo VACV	93
Figura 35 – Soropositividade para OPXV por PRNT	98
Figura 36 – Cartilha educativa sobre conhecimento e prevenção da VB no rebanho	99
Figura 37 – Cartilha educativa sobre a VB.....	100
Figura 38 – VACV à temperatura de refrigeração (4°C)	109
Figura 39 – Titulação do leite infectado.....	110
Figura 40 – Inativação térmica do VACV em diferentes tempos e temperaturas	111
Figura 41 – Inativação térmica do VACV em diferentes temperaturas	112
Figura 42 – Inativação térmica do VACV em diferentes temperaturas	113
Figura 43 – Mapa indicando as áreas de estudo	118
Figura 44 – Pontos amostrais dos animais positivos	123
Figura 45 – pontos amostrais de captura	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica da família	22
Tabela 2 – Classificação taxonômica dos ortopoxvírus	24
Tabela 3 – Participação do estado de Minas Gerais liderando o ranking de maior produtor de leite do Brasil nos anos de 2019/2020	47
Tabela 4 – Quantidade de reagentes utilizados para o PCR em tempo real	70
Tabela 5 – Iniciadores utilizados na reação de qPCR para detecção do gênero OPXV	70
Tabela 6 – Condições de tempo e temperatura da reação de qPCR	71
Tabela 7 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Maravilha.....	76
Tabela 8 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Amilton.....	79
Tabela 9 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Bom Sucesso.....	81
Tabela 10 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Ferreira Campos	82
Tabela 11 – Tabela representativa dos testes realizados e do número de amostras utilizadas neste trabalho	84
Tabela 12 – Grupos analisados por PRNT para o gênero OPXV	89
Tabela 13 – Faixa etária dos indivíduos participantes do estudo levando em consideração a vacinação contra a varíola até o ano de 1978.	94
Tabela 14 – Dados sobre consumo e manipulação de queijo	95
Tabela 15 – Dados demográficos dos indivíduos participantes do estudo com menos de 44 anos de idade.....	96
Tabela 16 – Dados do inquérito epidemiológico aplicado no estudo.....	98
Tabela 17 – Descrição das amostras testadas por espécie, habitat, data, ponto de amostragem, alvo e cidade	120

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ATCC	American Type Culture Collection
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
CEV	Vírus envelopado célula- associado
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG
CPXV	Vírus cowpox
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECMV	Vírus ectromelia
EEV	Vírus envelopados extracelulares
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
HA	Gene codificador da hemaglutinina viral
IEV	Vírus envelopado intracelular
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IMV	Vírus maduro intracelular
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
ITR	Regiões terminais invertidas
IV	Vírus imaturo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
mL	Mililitro
MPXV	Vírus monkeypox
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPXV	ortopoxvírus
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
PRR	Pattern recognition receptors
QMA	queijo minas artesanal
qPCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
Sebrae	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas empresas
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TLR	Toll like receptors
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UHT	Ultra high temperature
uL	Microlitro
UV	Ultravioleta
VACV	Vírus vaccínia
VACV-WR	Vírus vaccinia amostra Western Reserve
VARV	Vírus da varíola
VB	Vaccínia bovina
VGf	Gene codificador do fator de crescimento viral
°C	Graus celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Zoonoses	18
1.2 A família <i>Poxviridae</i> e o gênero <i>Orthopoxvirus</i>	21
1.2.1 Classificação taxonômica.....	21
1.2.2 Partícula e genoma	24
1.2.3 Ciclo de multiplicação.....	26
1.2.4 Patogênese.....	29
1.3 Vírus vaccínia	31
1.3.1 VACV e sua circulação no Brasil	33
1.3.2 Infecção pelo VACV: Características clínicas da doença e a excreção do vírus através do leite e fezes.....	36
1.3.3 VACV: Vias de infecção.....	40
1.3.4 Importância das espécies silvestres na disseminação do VACV	44
1.4 Produção de leite e derivados no estado de Minas Gerais	46
1.5 Queijo Minas, patrimônio cultural e fonte de renda dos mineiros.....	49
1.5.1 A importância do QMA para a economia da região do Serro-MG	52
1.5.2 QMA: a preocupação sanitária por trás do processo de produção e o impacto do VACV neste produto.....	54
1.6 Tratamento térmico do leite: Inativação do VACV através do calor.....	56
2 JUSTIFICATIVA	59
3 CAPÍTULO I – INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DO VACV: CONHECENDO O FLUXO DA PRODUÇÃO DE LATICÍNIOS E A CIRCULAÇÃO DO VÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E HUMANOS NA REGIÃO DO SERRO	61
3.1 Objetivos.....	61
3.1.1 Objetivo geral.....	61
3.1.2 Objetivos específicos	61
3.2 Fluxograma de trabalho	62

3.3 Materiais e métodos	63
3.3.1 Delineamento da área e população de estudo	63
3.3.2 Considerações éticas	64
3.3.3 Coleta de amostras	65
3.3.4 Avaliação clínica	66
3.3.5 Padronização das extrações de DNA	66
3.3.6 Processamento das fezes	67
3.3.7 Processamento do queijo	68
3.3.8 Vírus	68
3.3.9 Soros controles	68
3.3.10 Cultivo celular	68
3.3.11 Extração do DNA	69
3.3.12 Diluição das amostras de soro	69
3.3.13 PCR em tempo real	69
3.3.14 Titulação viral	71
3.3.15 Soroneutralização por redução de placa	71
3.4 Resultados e discussão	73
3.4.1 Caracterização das propriedades do estudo e amostras coletadas	73
3.4.2 Prospecção molecular de OPXV em amostras de soro	84
3.4.3 Prospecção do VACV em fezes dos bovinos	86
3.4.4 Prospecção molecular de OPXV em amostras de leite e queijo	88
3.4.5 Soropositividade para OPXV nas propriedades estudadas	89
3.4.6 Soropositividade anti-OPXV em humanos	94
3.4.7 Conhecimento dos ordenhadores/ produtores sobre a doença	98
3.4.8 Consumo de leite e queijo	100
3.5 Conclusão	103

4	CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA NECESSÁRIOS PARA INATIVAR O VACV EM LEITE EXPERIMENTALMENTE INFECTADO.....	104
4.1	Objetivos.....	104
4.1.2	Objetivo geral.....	104
4.1.3	Objetivos específicos	104
4.2	Fluxograma de trabalho	105
4.3	Materiais e métodos	106
4.3.1	Cultivo celular para titulação viral.....	106
4.3.2	Vírus.....	106
4.3.3	Titulação Viral	106
4.3.4	Infecção experimental do leite UHT Leite infectado.....	106
4.3.5	Avaliação da inativação de partículas virais	106
4.4	Resultados e discussão.....	108
4.4.1	A influência da temperatura na inativação do VACV.....	108
4.5	Conclusão.....	114
5	CAPÍTULO III – PROSPECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ORTHOPOXVÍRUS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DA REGIÃO NORTE DE MINAS GERAIS.....	115
5.1	Objetivos.....	115
5.1.1	Objetivo geral.....	115
5.1.2	Objetivos específicos	115
5.2	Fluxograma de trabalho	116
5.3	Materiais e métodos	117
5.3.1	Coleção de Primatas não humanos.....	117
5.3.2	Área de estudo.....	117
5.3.3	Processamento das amostras de fígado	118
5.3.4	Extração do DNA.....	118
5.3.5	Diluição das amostras de soro.....	119

5.3.6 PCR em tempo real	119
5.3.7 Soroneutralização por redução de placa (PRNT).....	119
5.4 Resultados e discussão.....	120
5.4.1 Investigação da circulação de OPXV em primatas não humanos da região norte do estado de Minas Gerais	120
5.4.2 Prospecção molecular de VACV em primatas não humanos da região norte do estado de Minas Gerais.....	126
5.5 Conclusão.....	128
REFERENCIAS	129
APÊNDICES	145

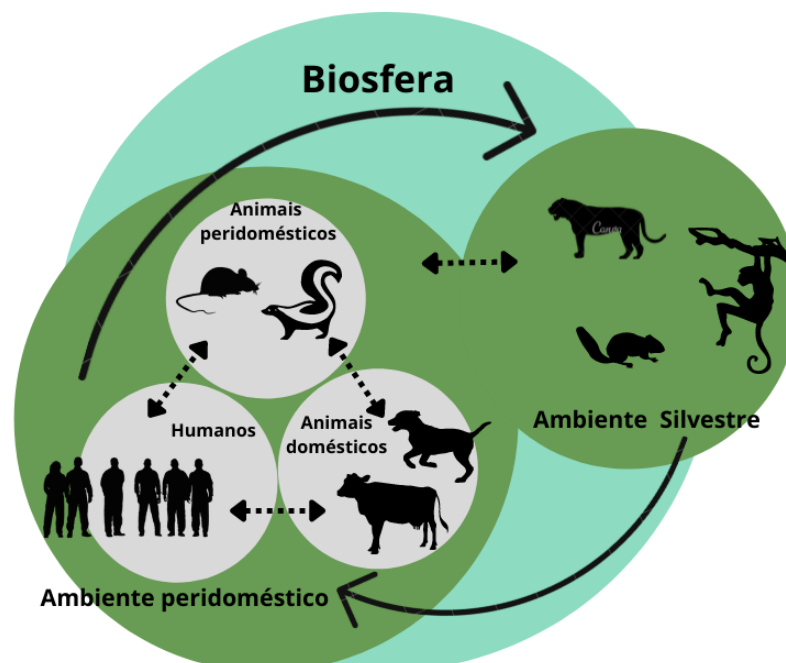
1 INTRODUÇÃO

1.1 Zoonoses

Os animais e seres humanos apresentam uma estreita relação desde os primórdios, isso porque o homem primitivo tinha a caça como fonte de alimento (LURIA, 1991). Esta relação se estreitou ainda mais no período neolítico, uma vez que os animais começaram a ser domesticados e a agricultura começou a surgir neste período. Esta maior aproximação fez com que as zoonoses, que são doenças transmitidas entre animais não humanos e seres humanos, passassem a ser cada vez mais frequentes (DA SILVA, 2018; MCARTHUR, 2019). Essa transmissão pode ocorrer através do contato direto homem-animal ou indireto, através de fômites, vetores, água e alimento (MCARTHUR, 2019; CDC, 2021).

Com o aumento crescente da população mundial, mais áreas são utilizadas para o plantio e criação animal, em proporções cada vez maiores, e tem em sua maioria sistemas intensivos de produção como o confinamento de bovinos (ZANELLA, 2016). Estes sistemas de criação afetam diretamente e potencializam a dispersão de patógenos inclusive aqueles capazes de infectar o homem. Na figura a seguir é possível observarmos de maneira esquemática esta inter-relação entre os ambientes (PAIM; ALONSO, 2020).

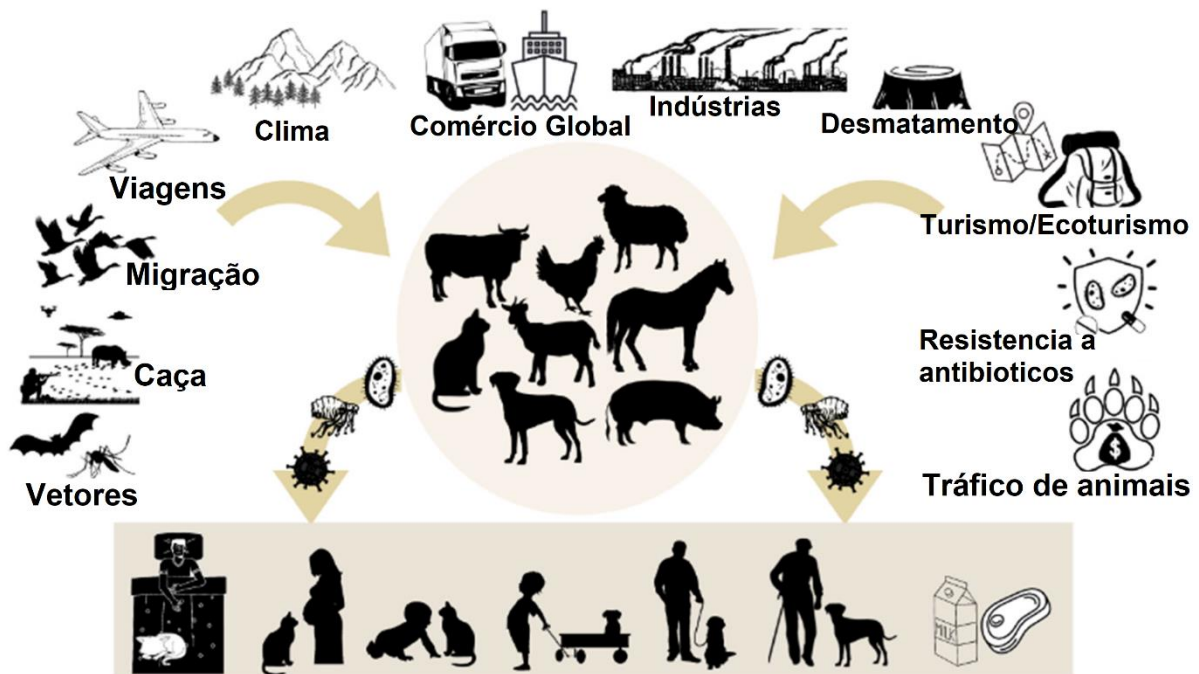
Figura 1 – Inter-relação entre os ambientes



A estreita relação entre os ambientes potencializa a dispersão de patógenos, aumentando a possibilidade do surgimento de zoonoses. Fonte: Modificado de BEDENHAM, et al., 2022.

Esta inter-relação entre o homem e os animais se torna cada vez mais próxima diante da crescente expansão da fronteira agrícola, a fim de suprir cada vez mais o mercado alimentício. Com isso, podemos observar o desmatamento de forma crescente e, conseqüentemente, a perda da diversidade (BRÜGGER, 2018). Estas modificações afetam diretamente a vida silvestre e aproxima o homem cada vez mais a patógenos que até então circulavam apenas em animais encontrados naturalmente em seus respectivos ecossistemas (DOS PASSOS; MARTINS, 2020). Como exemplos do homem invadindo cada vez mais os ambientes silvestres e “quebrando” as barreiras interespecies podemos citar além do significativo aumento da prática da pecuária intensiva, o aumento no transporte de animais vivos para o comércio, os processos de industrialização, incremento no uso indiscriminado de antibióticos levando a um aumento da resistência e o comércio global. Todas estas ações citadas são fatores que acarretam um aumento no potencial de disseminação de patógenos como pode ser observado na figura a seguir (GREEN,2022).

Figura 2 – Fatores que aumentam a ocorrência de zoonoses



Na figura podem ser observados alguns dos principais fatores relacionados à ação antrópica que podem contribuir para a emergência de patógenos zoonóticos. Fonte: Modificado de DO VALE et al., 2021.

Com relação ao aumento no potencial de disseminação de patógenos, estudos têm demonstrado que mais de 70% das doenças humanas apresentam caráter zoonótico (JONES *et al.*, 2008). Diante destes dados é possível observar que diversas pandemias e epidemias que assolaram a humanidade surgiram devido ao impacto antrópico na natureza e no modo de vida

dos animais. A exemplo disso podemos citar a emergência da influenza, dengue, chikungunya, zika e mais recentemente da COVID 19 e mpox (MORENS & FAUCI, 2020; BUNGE et al. 2022).

As infecções zoonóticas viabilizam-se em virtude da estreita proximidade genética entre os seres humanos e outros animais, sobretudo os mamíferos. Isso ocorre porque, mais da metade do DNA humano se assemelha ao DNA dos demais vertebrados. Devido a esta proximidade genética, é possível que um patógeno animal infecte a espécie humana. Este fenômeno da passagem de um patógeno animal para humano é chamado de transbordamento zoonótico (*spill over*) que nada mais é do que o surgimento de uma doença humana oriunda do contato direto ou indireto com animais não humanos. Para que ocorra esse transbordamento, caracterizado pelo salto de hospedeiro ou pela transmissão cruzada entre espécies, torna-se essencial a instauração de uma dinâmica de contato humano-animal invasiva e persistente. Assim, é possível que o patógeno consiga se adaptar ao novo hospedeiro como podemos observar na figura a seguir (DE WIT *et al.*, 2016; BORREMANS *et al.* 2019).

Figura 3 – Transbordamento zoonótico



Demonstração do salto interespecies, fenômeno conhecido como transbordamento ou salto zoonótico. É este ciclo o responsável pela origem das zoonoses no mundo. Fonte: Modificado de PLOWRIGHT et al., 2021.

Vários vírus foram capazes de realizar o fenômeno do transbordamento zoonótico. Entretanto, a compreensão acerca de muitos desses agentes ainda é limitada em escala global, e essa lacuna de conhecimento persiste igualmente em nosso país, que se destaca pela grande diversidade de espécies em âmbito mundial (UNEP, 2019).

O Brasil, que é substancialmente reconhecido pela sua mega biodiversidade, possui a maior cobertura de florestas tropicais, e com ela a mais rica flora do mundo, assim como uma fauna igualmente importante. Tal biodiversidade está distribuída em seis biomas continentais. No planeta, dos atuais duzentos países, apenas dezessete são considerados mega diversos e possuem juntos 70% da biodiversidade mundial. Dentre eles, o Brasil está em primeiro lugar desta lista (MMA, 2018; UNEP, 2019).

Esta grande diversidade também traz consigo a possibilidade de ocorrências de eventos de transbordamento, uma vez que o *pool* zoonótico é bastante rico nas áreas com altos índices de biodiversidade que são, também, as mais vulneráveis às ações antrópicas. Ações de modificação dos ecossistemas são alguns dos principais fatores que contribuem para a emergência de zoonoses (JONES, 2008; OLIVAL *et al.* 2017; WHO, 2015).

Dentre os patógenos zoonóticos no Brasil, podemos destacar o vírus vaccínia (VACV). O VACV foi capaz de realizar o salto zoonótico, e mesmo atualmente sendo um dos vírus mais estudados dentro da virosfera, possui sua origem, assim como o seu o reservatório desconhecidos (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). Do mesmo modo, a doença acarretada por este vírus, a vaccínia bovina (VB) ainda é pouco conhecida e muitas vezes negligenciada tanto pelas instâncias governamentais quanto pelos profissionais envolvidos diretamente com os animais afetados, a exemplo de veterinários e profissionais da saúde (DOMINGOS *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

1.2 A família *Poxviridae* e o gênero *Orthopoxvirus*

1.2.1 Classificação taxonômica

O VACV é um ortopoxvírus (OPXV), pertencente ao gênero *Orthopoxvirus* e à família *Poxviridae*. A família *Poxviridae* é composta por vírus geneticamente e morfológicamente complexos, apresentando duas subfamílias que são a *Entomopoxvirinae* e a *Chordopoxvirinae*. A subfamília *Entomopoxvirinae* apresenta quatro gêneros e possui espécies virais capazes de infectar animais invertebrados. Já a subfamília *Chordopoxvirinae*, possui dezoito gêneros e abarca vírus que infectam animais vertebrados (ICTV, 2023). Dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, podemos destacar os OPXV, objeto do nosso estudo. A tabela a seguir descreve a organização taxonômica da família *Poxviridae* (Tabela 1).

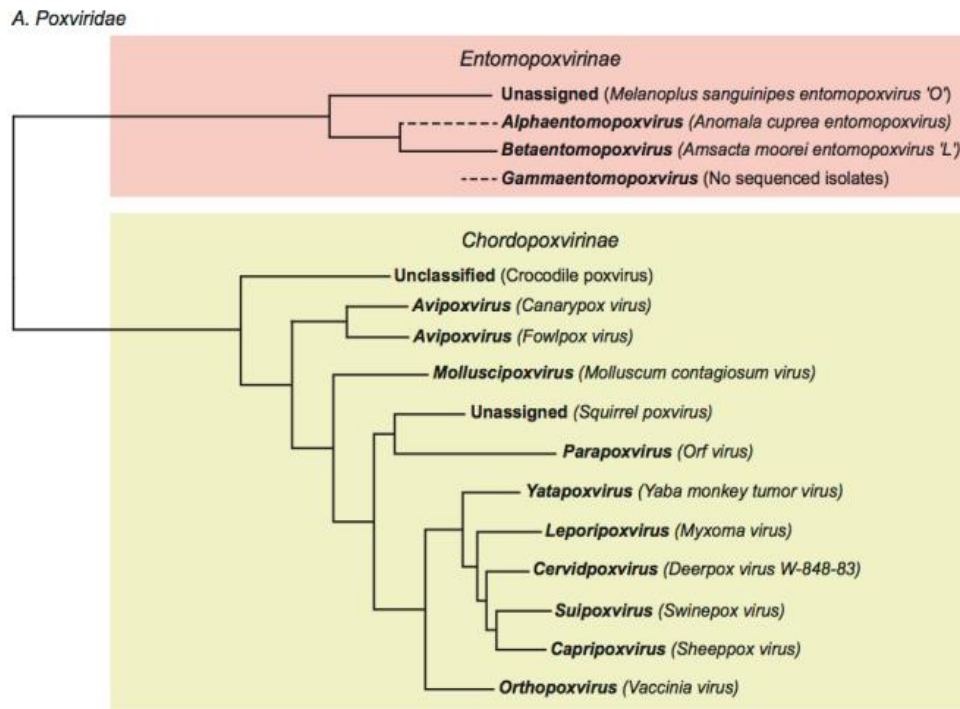
Tabela 1 – Classificação taxonômica da família

Subfamília	Gênero	Nº de espécies
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	16
	<i>Deltaentomopoxvirus</i>	1
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6
	*	<i>Diachasmimorpha entomopoxvirus</i>
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	12
	<i>Capripoxvirus</i>	3
	<i>Centapoxvirus</i>	2
	<i>Cervidpoxvirus</i>	1
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1
	<i>Leporipoxvirus</i>	4
	<i>Macropopoxvirus</i>	2
	<i>Molluscipoxvirus**</i>	1
	<i>Mustelpoxvirus</i>	1
	<i>Orthopoxvirus**</i>	12
	<i>Oryzopoxvirus</i>	1
	<i>Parapoxvirus**</i>	5
	<i>Pteropopoxvirus</i>	1
	<i>Salmonpoxvirus</i>	1
	<i>Sciuripoxvirus</i>	1
	<i>Suipoxvirus</i>	1
<i>Vespertilionpoxvirus</i>	1	
<i>Yatapoxvirus**</i>	2	

Representação dos gêneros e número de espécies classificados em cada subfamília da família *Poxviridae*. Fonte: ICTV, 2023.

Os vírus pertencentes a esta família, apresentam genoma dupla fita de DNA e se multiplicam no citoplasma das células hospedeiras (FENNER, 1989; SMITH & MCFADDEN, 2002).

Figura 4 – Diagrama Filogenético



Família *Poxviridae* e as subfamílias *Entomopoxvirinae* e *Chordopoxvirinae*. Fonte: ICTV, 2023.

O gênero OPXV, abriga doze espécies em sua classificação, sendo eles patógenos de grande importância humana e veterinária. Entre os integrantes desta linhagem, é pertinente ressaltar o vírus da varíola (VARV), cuja erradicação foi oficialmente declarada em 1980, resultado de uma abrangente campanha global de imunização liderada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). É relevante salientar que o VACV desempenhou um papel crucial na produção da vacina contra esse patógeno durante a referida campanha (FENNER, 1989; SMITH & MCFADDEN, 2002).

A formulação da vacina proveniente do VACV tornou-se viável devido à preservação genética observada nos vírus pertencentes a esse gênero, resultando em uma proteção cruzada. A vacina contra a varíola foi, portanto, desenvolvida utilizando o VACV, o qual apresentava efeitos colaterais mais atenuados em comparação com aqueles derivados do VARV, conferindo, assim, imunidade contra este patógeno (DAMASO, 2018; GUBSER *et al.*, 2004; FENNER *et al.*, 1988).

Os ortopoxvírus, com exceção do VARV que é capaz de infectar apenas seres humanos, possuem um amplo espectro de hospedeiros, sendo estes pertencentes ao domínio *Eukarya*, reino *Animalia*, filo *Chordata*, sub-filo *Vertebrata*. Os OPXV compreendem um gênero da

subfamília *Chordopoxvirinae*, que agrupa vírus capazes de infectar hospedeiros pertencentes às ordens *Primates*, *Artiodactyla*, *Perissodactyla*, *Pholidota* e *Lagomorpha* (ICTV, 2022).

Tabela 2 – Classificação taxonômica dos ortopoxvírus

Gênero	Espécies
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Abatino macacapox virus</i>
	<i>Akhmeta virus</i> *
	<i>Camelpox virus</i>
	<i>Cowpox virus</i> *
	<i>Ectromelia virus</i>
	<i>Monkeypox virus</i> *
	<i>Raccoonpox virus</i>
	<i>Skunkpox virus</i>
	<i>Taterapox virus</i>
	<i>Vaccinia virus</i> *
	<i>Variola virus</i> *
	<i>Volepox virus</i>

Espécies de ortopoxvírus. * Representa OPXV que infectam humanos, além de outros animais. Fonte: ICTV, 2023.

Destacamos como OPXV de significativa relevância contemporânea o VACV, o vírus monkeypox (MPXV) e o vírus cowpox (CPXV), em virtude de surtos recentes associados a esses agentes (ALBARNAZ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2021).

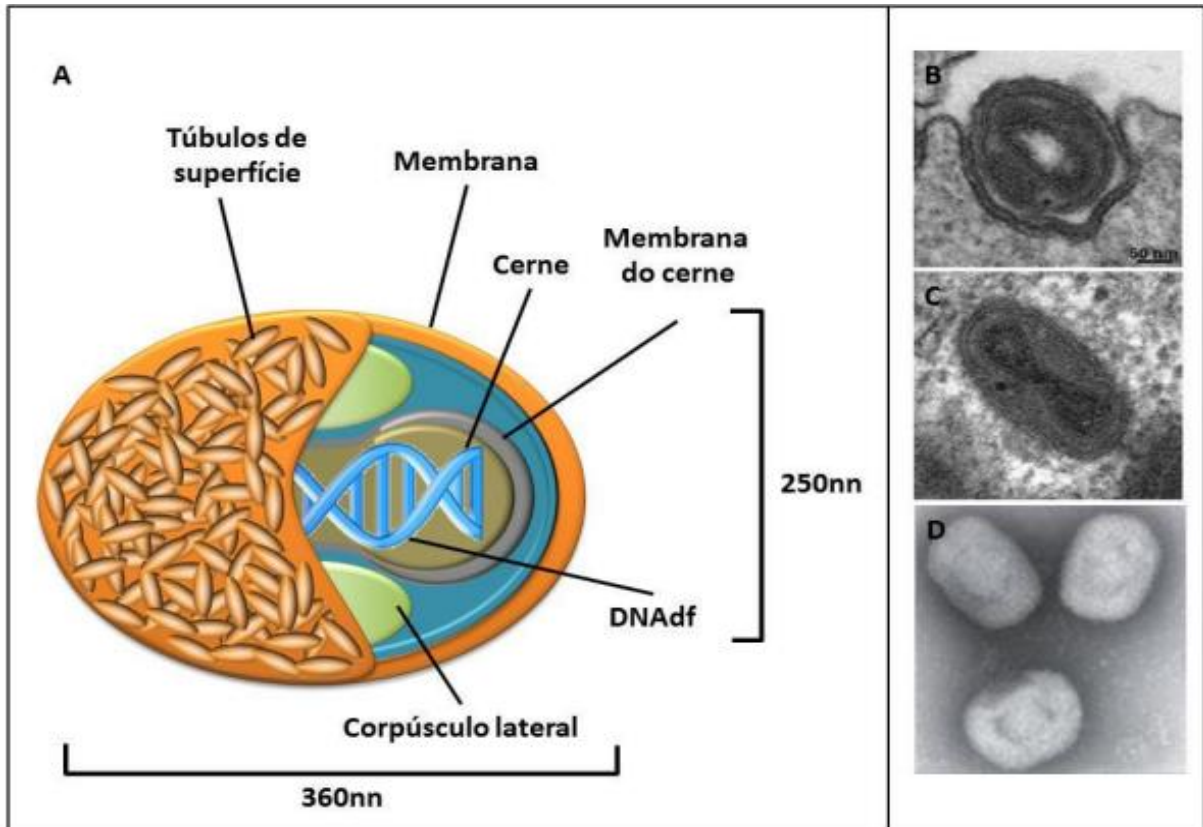
1.2.2 Partícula e genoma

O VACV foi um dos primeiros vírus a ter sua estrutura analisada por microscopia eletrônica (FENNER *et al.*, 1989; DUBOCHET *et al.*, 1994). Através desta técnica, foi possível observar que os vírions desta família apresentam pleomorfismo em sua estrutura, apresentando o formato da partícula ovoide ou semelhante a um tijolo com a presença de uma membrana externa de natureza lipídica, seu tamanho pode variar entre 200 e 360 nm (CYRKLAFK *et al.*, 2005). As quatro estruturas fundamentais que compreendem as partículas virais, como podemos ver na figura 5, são: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope.

O material genético dos poxvírus consiste em uma molécula de DNA dupla fita covalentemente fechada em suas extremidades. Este material genético se encontra dentro do cerne, assim como as proteínas que também são organizadas dentro desta estrutura, formando assim o nucleocapsídeo. Esta estrutura, é, portanto, o arranjo mais interno da partícula, apresentando formato de disco bicôncavo (em forma de haltere) envolvido por uma membrana (MOSS, 2013). Lateralmente ao cerne, encontram-se estruturas de formas ovoides denominadas

corpúsculos laterais cuja composição química e função ainda são desconhecidas. Mais externamente, portanto, encontra-se a membrana e a envolvendo o envelope.

Figura 5 – Morfologia da partícula do VACV



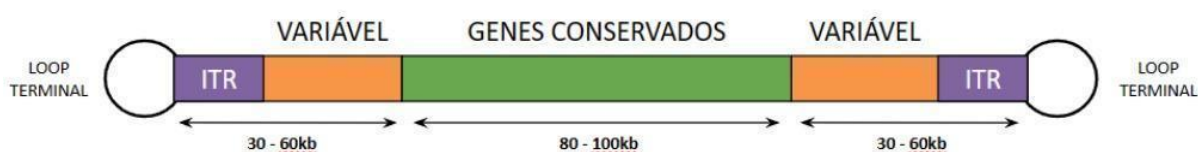
A) Ilustração esquemática da partícula. B) Vírion envolado extracelular (EV) em processo de fusão do envelope viral à membrana plasmática da célula hospedeira. C) Visualização de única partícula viral de vírion maduro (MV) no citoplasma da célula hospedeira. D) Vírions em forma de tijolo em microscopia eletrônica de coloração negativa. Fonte: Elaborado por Laboratório de Vírus da UFMG; Modificado de MOSS, 2013 e VORA et al., 2015.

O genoma dos poxvírus é altamente conservado, constituído por uma molécula dupla fita linear de DNA, não segmentada, com tamanho variando entre 130kb (gênero *Parapoxvirus*-PPV) a 375kb (gênero *Avipoxvirus*), que codifica aproximadamente 200 genes. Apresenta um conteúdo de G+C variando entre 35-64% nos *Cordopoxvirus* e cerca de 20% em *Entomopoxvirus* (MOSS, 2013; ICTV,2022).

No que diz respeito às características estruturais, o genoma dos poxvírus, especialmente dos OPXV, possui uma região central que contém majoritariamente genes que codificam proteínas estruturais e proteínas essenciais à replicação do vírus. Devido a sua alta conservação, através de testes moleculares e sorológicos é possível realizar a detecção do gênero ao qual estes vírus pertencem, assim como anticorpos produzidos contra o gênero. Nesse sentido, vale

destacar o gene A56R presente na região central, responsável por codificar a hemaglutinina viral (HA), uma glicoproteína de superfície do envelope viral. No genoma dos OPXV estão presentes, ainda, regiões terminais em ambas as extremidades contendo sequências repetidas e invertidas (ITR), que albergam geralmente genes que codificam principalmente proteínas responsáveis pela virulência e imunomodulação como podemos destacar o gene C11R responsável por codificar o fator de crescimento viral (VGF) e que é um marcador molecular que pode ser utilizado para caracterizar uma região altamente conservada entre os membros deste grupo (MOSS, 2013; SMITH et al., 2002).

Figura 6 – Representação esquemática do genoma dos poxvírus



A região central do genoma apresenta genes altamente conservados, que codificam Fonte: Adaptado de SMITH e MCFADDEN, 2002.

1.2.3 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação dos poxvírus, que ocorre inteiramente no citoplasma da célula infectada, é complexo em virtude da variedade de partículas virais que são formadas, seu genoma complexo, síntese de grande número de genes e da alta interação com o hospedeiro. O VACV é a espécie viral mais estudada e bem caracterizada da família e, devido a isso, as informações a seguir são relativas ao seu ciclo de multiplicação que reflete os mecanismos que ocorrem durante o ciclo de multiplicação de todos os membros da família *Poxviridae* (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013).

Existem duas formas infecciosas da partícula viral dos OPXV, os vírus maduros (MV) e os vírus envelopados (EV), esta forma infecciosa implicará em algumas diferenças na etapa de penetração. A penetração dos MV, e conseqüente liberação do cerne no citoplasma, podem ocorrer de duas formas, a primeira pela fusão da membrana externa com a membrana plasmática e a segunda após macropinocitose. Já a internalização dos EV ocorre por macropinocitose, seguida pela ruptura do envelope, a fusão da membrana externa com a membrana endossomal e liberação do cerne (VANDERPLASSCHEN *et al.*, 1998; MOSS, 2013).

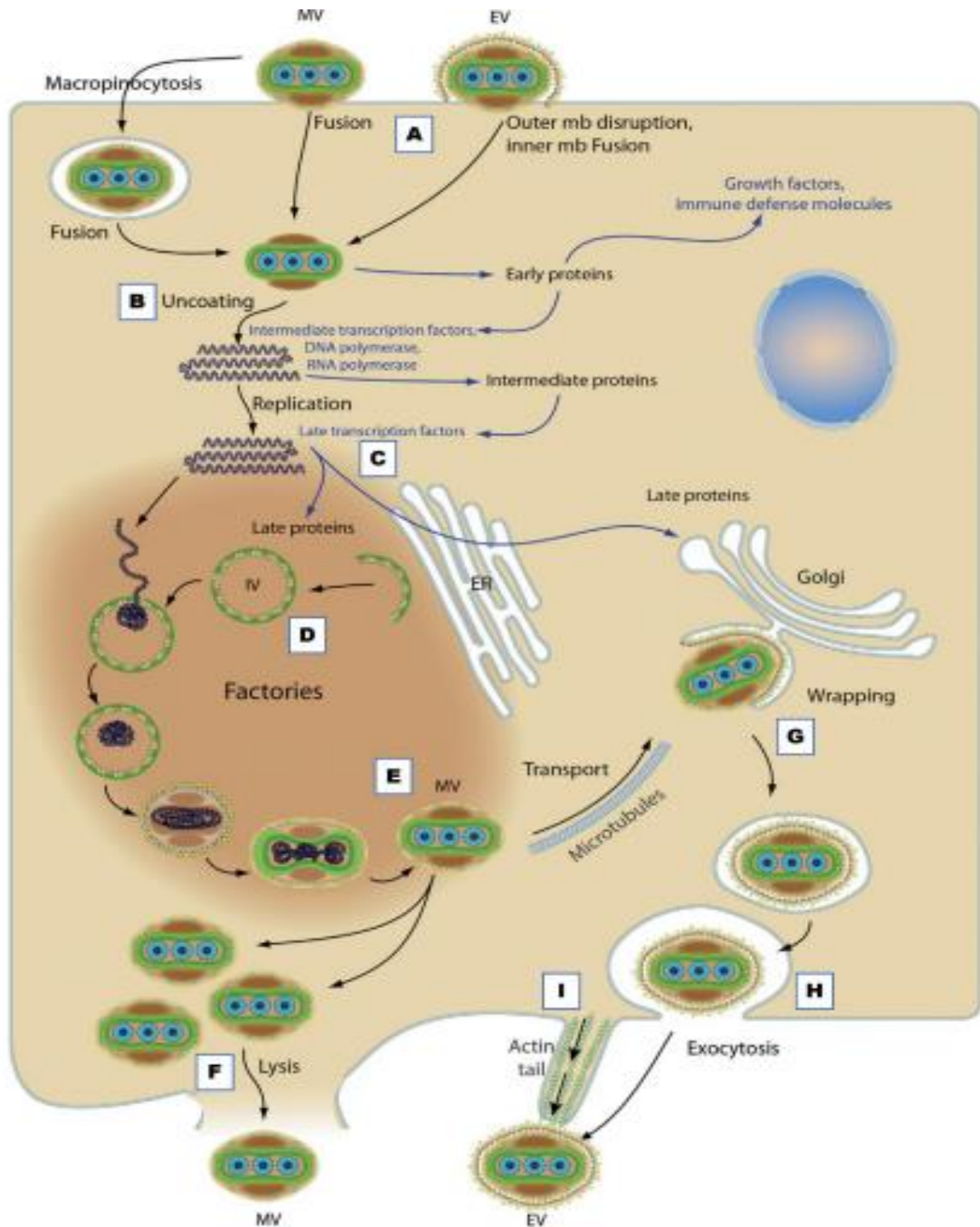
A transcrição tem início ainda dentro do cerne e as proteínas precoces produzidas estão envolvidas na fase do desnudamento secundário, imunomodulação do hospedeiro, seguida da replicação do genoma e posteriormente na transcrição de genes intermediários. Os transcritos

intermediários por sua vez, codificam fatores de transcrição dos genes tardios e estes codificam proteínas estruturais e fatores transcricionais precoces que serão incorporados às novas partículas virais (PRICHARD e KERN, 2012; MOSS, 2013; GUO *et al.*, 2019).

Sequencialmente ocorre a replicação do genoma e posterior montagem da progênie no que chamamos de “fábrica viral”, que compreende uma região eletrodensa no citoplasma, com poucas ou sem organelas, localizada próximo ao retículo endoplasmático (CONDIT *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2014). No decorrer da replicação do DNA há formação de concatâmeros que, ao final, formarão uma única fita (PRICHARD & KERN, 2012; MOSS, 2013).

A montagem da progênie é caracterizada pela formação de crescentes, que são estruturas formadas por membranas oriundas do retículo endoplasmático e estabilizadas pela proteína scaffold viral D13. Após aumentarem o comprimento, as crescentes, se tornam esféricas formando os vírus imaturos (IV). Após modificações proteolíticas, os IV dão origem aos MV, que será transportado para fora da fábrica viral. Os MV são liberados da célula somente após a lise. Entretanto, parte dos MV são envolvidos por duas membranas derivadas do complexo de Golgi, sendo denominados de vírus envelopados intracelulares (IEV). Os IEV são conduzidos através dos microtúbulos até a membrana plasmática e, após fusão desta com a membrana mais externa, ocorre a liberação dos EV. Alguns dos EV podem permanecer associados à superfície celular (CEVs) e serem disseminados célula a célula após ativarem a formação de caudas de actina (CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2013; LIU *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2019). O ciclo de multiplicação do VACV está apresentado abaixo.

Figura 7 – Ciclo de multiplicação dos poxvírus



As duas formas infecciosas dos poxvírus, o vírus envelopado extracelular/vírus envelopado associado à célula (EEV/CEV) e o vírus maduro intracelular (IMV), iniciam seu ciclo com a adsorção e penetração na célula hospedeira. Em seguida liberam o cerne no citoplasma, processo denominado desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese das proteínas precoces ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma, desnudamento secundário. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam na replicação do DNA viral. Após o início da replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, ocorre a montagem dos IMV, que se acumulam no citoplasma e são liberados através da lise celular. Uma parte dos IMV adquire duas camadas de membranas adicionais, nas cisternas trans-Golgi e, posteriormente, são propulsores por meio de processos dependentes das caudas de actina para as células vizinhas (CEV) ou liberadas no meio extracelular (EEV). Fonte: Modificado de MCFADDEN, 2005.

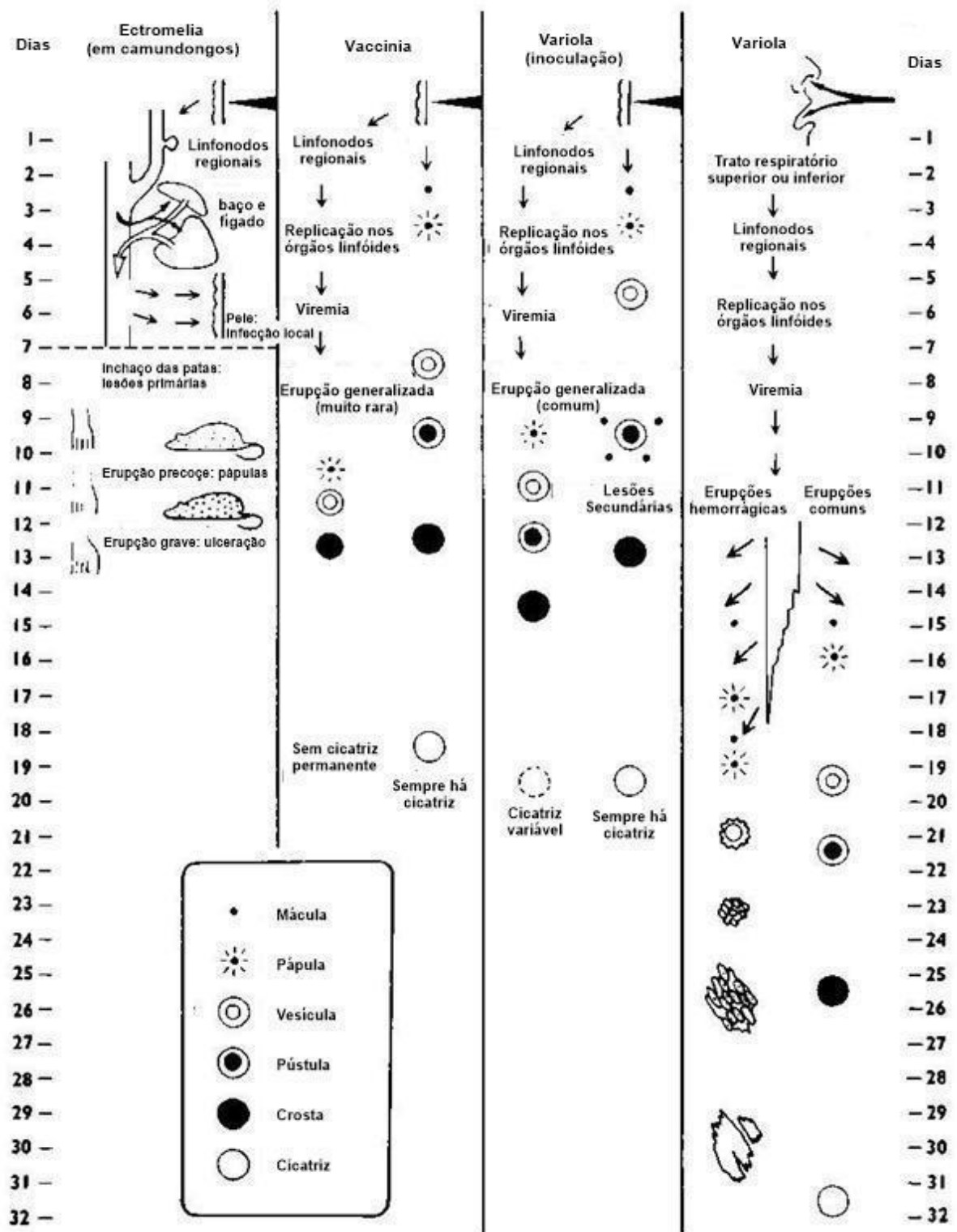
1.2.4 Patogênese

A patogênese decorrente das infecções por poxvírus é substancialmente afetada pela interação entre o tropismo viral e as respostas imunológicas e inflamatórias do hospedeiro. O tropismo é caracterizado pela afinidade preferencial do vírus por determinados tecidos ou células, está intimamente relacionado com as características do gênero viral, assim como com os genes codificados pela região variável do genoma. Essa região genômica variável desempenha um papel determinante na especificidade de hospedeiros e na plasticidade evolutiva do vírus (DAMON, 2013; MCFADDEN, 2005).

Os poxvírus possuem a capacidade de infectar vertebrados pertencentes à subfamília Chordopoxvirinae e compartilham diversas características biológicas em comum. A infecção ocasionada por esses vírus, em sua maioria, ocorre por via percutânea, uma vez que o vírus adentra o hospedeiro por meio de lesões presentes na pele. Este modo de entrada é exemplificado na infecção causada pelo VACV. Entretanto, é importante destacar que determinados poxvírus adotam vias alternativas de entrada. Por exemplo, o VARV penetra pelo trato respiratório, enquanto o vírus ectromelia (ECTV) utiliza a via gastrointestinal. Estas considerações ressaltam a diversidade de estratégias empregadas pelos poxvírus para estabelecerem infecções, sublinhando a complexidade e a adaptabilidade desses agentes patogênicos (FENNER *et al.*, 1988; ESTEBAN & BULLER, 2005; MCFADDEN, 2005).

Na infecção por via percutânea ou mucosa, evidências provenientes de estudos experimentais indicam que, após a entrada do vírus no organismo do hospedeiro, ocorre a replicação viral no local primário de infecção. Este processo é sucedido pela migração do vírus dos linfonodos regionais para a corrente sanguínea. Tal sequência de eventos culmina na manifestação da viremia primária, na qual o vírus pode disseminar-se pelo organismo, associando-se tanto a células sanguíneas quanto permanecendo de forma livre no plasma circulante. Este fenômeno, essencial para a compreensão dos mecanismos de disseminação viral, contribui significativamente para a elucidação da dinâmica da infecção em nível sistêmico (DAMON, 2013).

Figura 8 – Modelo esquemático do curso da infecção de alguns OPXV



Esquema da patogênese viral de diferentes espécies de OPXV. Fonte: Modificado de FENNER, 1988.

A disseminação através da corrente sanguínea propicia a infecção de diversos órgãos, como o fígado, baço e linfonodos, os quais se destacam pela elevada vascularização. Aproximadamente cinco dias após a infecção, é possível observar a instauração da viremia

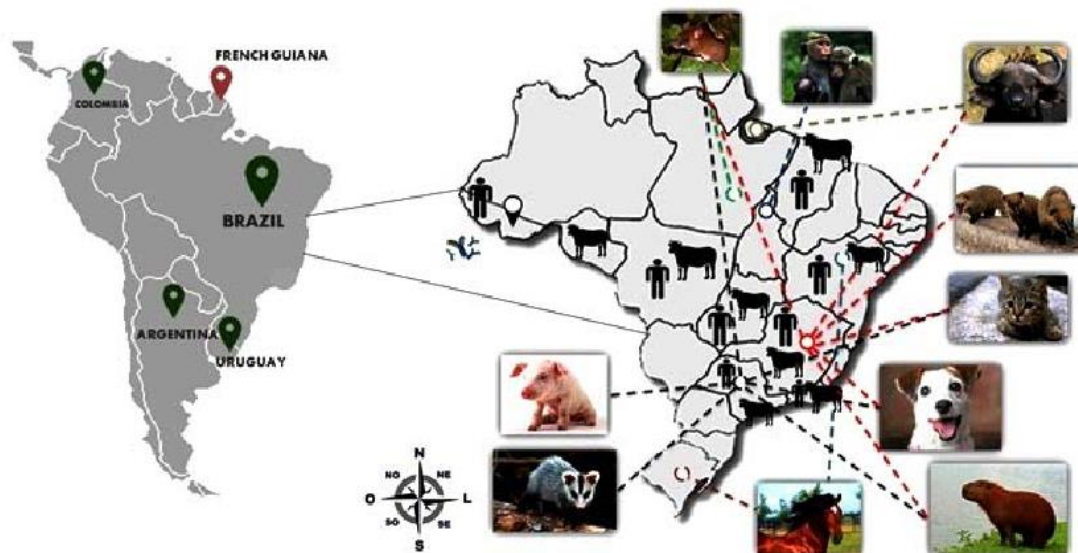
secundária, caracterizada pela migração das partículas virais em direção à pele e subsequente desenvolvimento de lesões ulcerativas (FENNER, 1988; ESTEBAN & BULLER, 2005; DAMON *et al.*, 2013).

1.3 Vírus vaccínia

Como descrito anteriormente, o VACV é um poxvírus pertencente à subfamília *Chordopoxvirinae*, gênero *Orthopoxvirus*, sendo o agente etiológico da VB, uma doença exantemática que afeta gado leiteiro e ordenhadores. Apesar de ser considerada uma zoonose ocupacional por estar intimamente relacionada ao processo de ordenha, este vírus apresenta um amplo espectro de hospedeiros englobando animais domésticos, silvestres e os seres humanos (MOSS, 2013, FENNER *et al.*, 1988).

Estudos demonstram a circulação do VACV em alguns países da América do Sul, como Colômbia, Argentina e Uruguai, mas é no Brasil onde ele foi detectado nas mais variadas espécies como canídeos, equinos, primatas não humanos, dentre outros, como pode ser observado na figura 9 (OLIVEIRA *et al.*, 2017, ABRAÃO *et al.*, 2009).

Figura 9 – Distribuição do VACV na América do Sul



Os pinos em verde indicam os países onde o VACV foi detectado recentemente, o pino vermelho indica a ausência de detecção de VACV. O mapa do Brasil destaca a distribuição do VACV em diferentes regiões e a detecção do VACV em uma ampla gama de hospedeiros. As linhas tracejadas em cores diferentes representam a circulação do VACV em diferentes estados brasileiros. As linhas tracejadas vermelhas representam a circulação do VACV no Estado de Minas Gerais, as linhas tracejadas pretas representam a circulação no Estado de São Paulo e as linhas tracejadas verdes representam a circulação no estado do Pará. Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2017.

O VACV possui grande notoriedade dentro da família *Poxviridae*, pois historicamente, foi considerado a espécie protótipo da família, sendo vastamente estudado em diversas frentes que compreenderam desde estudos sobre a biologia básica dos OPXV a estudos de imunobiológicos. Estes estudos, visaram compreender melhor sobre a resposta imunológica frente ao hospedeiro infectado, sua patogenia, assim como o curso clínico da doença, envolvendo, modelos de estudos que avaliam a interação vírus-hospedeiro e a biologia viral (FENNER, 2000; ISAACS, 2019; MOSS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, o VACV tem sido objeto de interesse e investigação, especialmente devido aos surtos recentes de mpox que têm ocorrido globalmente. A intensificação do interesse no VACV é atribuível ao seu status como um OPXV amplamente estudado, bem como à sua proximidade genética com o MPXV. Essa afinidade genética sugere que o VACV possa servir como um mediador promissor para esclarecer aspectos do curso clínico da doença provocada pelo MPXV, bem como eventuais complicações associadas a essa enfermidade (RIZK, *et al.*; 2022, PETERSEN, *et al.*; 2016; CDC, 2007).

Mas os holofotes voltados ao VACV não ocorreram apenas na atualidade. O VACV desempenhou um papel crucial durante a campanha de vacinação conduzida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), cujo objetivo era a erradicação global da varíola, feito que foi efetivado em 1980, representando um marco histórico na eliminação mundial desta doença. Nesse contexto, o VACV destacou-se como de suma importância, sendo empregado no processo de fabricação das vacinas contra a varíola, devido à manifestação de imunidade cruzada entre os OPXV e à sua apresentação clínica mais benigna quando comparada ao vírus da varíola (FENNER *et al.*, 1989; FENNER, 2000).

Apesar do extenso número de estudos conduzidos com este vírus e seu importante papel na história da virologia, muitos questionamentos acerca da sua história natural ainda permanecem sem respostas, como por exemplo sua origem seu reservatório natural no meio (MOSS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Embora não haja consenso sobre sua origem, existem algumas hipóteses acerca deste tema. Uma delas é a origem da linhagem conhecida como VACV-IOC, que pressupõe que tenha ocorrido devido a importação da linhagem vacinal pelo Instituto Oswaldo Cruz durante a campanha de vacinação contra a varíola ocorrida no século XX. Além da linhagem VACV-IOC, no processo de vacinação também foi utilizada a linhagem VACV-Lister, oriunda do Instituto Lister, na Inglaterra, importada e com vacinas produzidas a partir dela pelo Instituto Butantan, no estado de São Paulo. Dessa forma, presume-se que a origem dos VACV circulantes no Brasil tenha relação com estas linhagens (DAMASO, 2018; MOSS, 2013;

TRINDADE *et al.*, 2007).

1.3.1 VACV e sua circulação no Brasil

Após a erradicação da varíola na década de 80, infecções zoonóticas ocasionadas por outros OPXV foram reportadas em diversas partes do globo, como infecções por CPXV na Europa, MPXV na África Central e Ocidental, e VACV, na América do Sul, principalmente no Brasil (FERRIER *et al.*, 2021; DAMASO *et al.*, 2000; DURSKI *et al.*, 2018; TRINDADE *et al.*, 2003).

O VACV foi descrito pela primeira vez como causador de infecções naturais no Brasil no final do século 20. Este vírus é amplamente distribuído por todo território nacional e nos últimos vinte anos, diversas características do vírus e da doença causada por ele vêm sendo investigadas e descritas. Além da abrangente dispersão por todo o território nacional, a extensa diversidade de hospedeiros do VACV constitui um elemento de significativa importância no contexto de sua preservação e persistência nos ecossistemas naturais (LIMA *et al.*, 2019; KROON *et al.*, 2011; DOMINGOS *et al.*, 2022).

A origem das amostras de VACV distribuídas no mundo e das circulantes no Brasil (VACV-BR), ainda não foi totalmente elucidada. Acreditava-se que o seu surgimento estaria relacionado com as amostras vacinais utilizadas nas campanhas de vacinação para a erradicação da varíola no país até 1980 como anteriormente descrito (DAMASO *et al.*, 2000). No entanto, vários isolados circulantes no país foram caracterizados e revelaram uma grande variabilidade genética entre eles, o que sugere a existência de diferentes origens para os vírus brasileiros (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Ao buscar compreender a origem deste vírus, estudos demonstraram a existência da circulação de dois grupos (Grupo I e Grupo II) filogeneticamente distintos no país, os quais apresentam diferentes padrões de virulência e características fenotípicas distintas (DRUMOND *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2007; TRINDADE *et al.*, 2016). Estudos subsequentes demonstraram ainda diferenças genéticas entre os seus representantes (Figura 10).

Em ensaios clínicos utilizando o modelo murino, o Grupo I apresentou menor virulência quando comparado ao Grupo II. Este primeiro grupo é ainda mais frequentemente encontrado em surtos no país. Por sua vez, as amostras pertencentes ao grupo II são mais virulentas quando comparadas ao primeiro grupo e menos encontradas em surtos pelo território nacional. Contudo, estudos demonstram, ainda, a co-circulação dos dois grupos, podendo inclusive serem isolados de uma mesma região ou até estarem presentes em um mesmo evento de surto (CALIXTO *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2008a; MIRANDA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017;

TRINDADE *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2010).

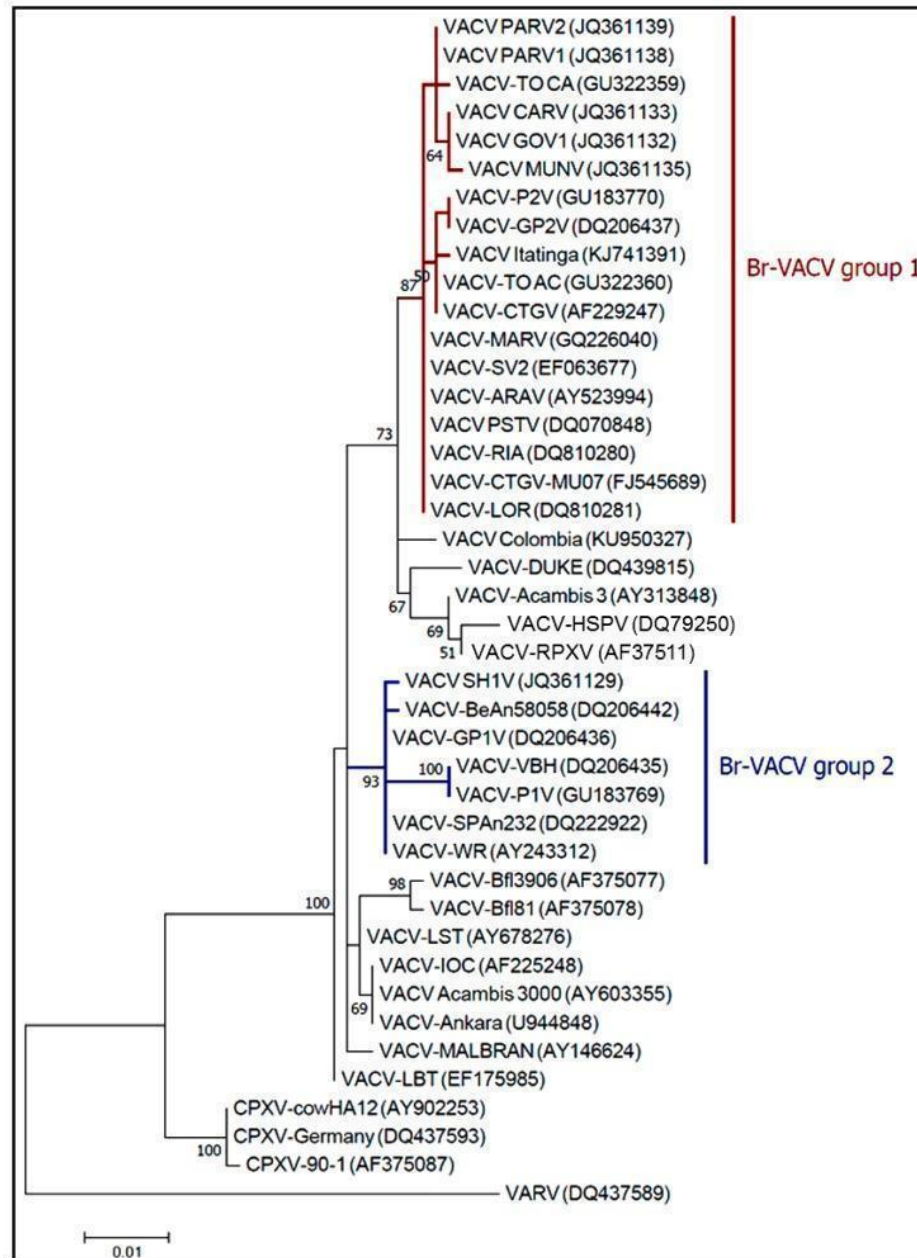
FERREIRA *et al.*, 2008 demonstraram que, os dois grupos apresentam diferenças em relação à virulência em modelo murino. Os animais infectados com o VACV do grupo II apresentaram sinais clínicos graves que levaram à óbito, enquanto os infectados com o grupo I eram assintomáticos. Outro importante fator a ser destacado, é a diferença no tamanho das placas de lise em células BSC-40, em que o grupo II apresenta placas de lise maiores em relação ao do grupo I (CAMPOS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Após a divisão dos grupos I e II o gene A56R, tem sido amplamente utilizado na caracterização de VACV-Br de isolados do grupo II (como os isolados: BeAn 58058, Belo Horizonte (VBH), Guarani P1 (Gp1), Pelotas 1 (P1V) e Serro humano 2 (SH2V) não possuem a deleção de 18 nt (ou 6 aminoácidos) observada no grupo I (Araçatuba (ARAV), Serro 2 (S2V); Cantagalo (CTGV), Guarani P2 (GP2V), Passatempo (PSTV), MARV e Pelotas 2 (P2V) (TRINDADE *et al.*, 2007b; DRUMOND *et al.*, 2008).

É importante salientar que através de análises de outros genes, foi demonstrado que os VACV-Br são agrupados em clados distantes de algumas amostras vacinais utilizadas no Brasil (Lister-Butantan) (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008; KROON *et al.*, 2011).

Estudos mais recentes, nos quais foram analisadas sequências completas de CTGV e S2V, demonstram que estes isolados estão relacionados à linhagem vacinal IOC (MEDAGLIA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2020). No entanto, a carência de sequências genômicas completas dos demais isolados dificulta a elucidação da origem dos VACV brasileiros (KROON *et al.*, 2011; MOSS, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2007, DRUMOND *et al.*, 2008).

Figura 10 – Classificação filogenética do VACV baseado no gene A56R



Em vermelho os representantes do grupo I e em azul os representantes do grupo II em destaque. Fonte: OLIVEIRA et al., 2017.

Apesar da importância histórica do VACV, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais este vírus persiste na natureza (FENNER *et al.*, 1989; DRUMOND *et al.*, 2008; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Estudos conduzidos por Abrahão *et al.* 2010, demonstraram a detecção do VACV em animais silvestres na Amazônia brasileira os quais devido a área de captura não apresentavam nenhum contato prévio com humanos e gado leiteiro (ABRAHÃO *et al.*, 2010).

Em 2009, Abrahão e colaboradores, demonstram a participação de roedores na cadeia de transmissão VACV. Como algumas espécies de roedores nativos podem ter vantagens

ecológicas, hipotetiza-se que elas possam funcionar como pontes entre habitats naturais e humanos / domésticos, trazendo vírus de animais silvestres para domésticos e vice-versa (ABRAHÃO *et al.*, 2009). Além dos roedores, os primatas não humanos também podem servir como meio de manutenção do VACV no ambiente silvestre como já foi demonstrada a sua detecção nestes animais (DOMINGOS *et al.*, 2022; MIRANDA *et al.*, 2017).

Apesar do VACV ser amplamente distribuído por todo território nacional, é a região sudeste do Brasil apontada como epicentro da circulação deste vírus no país, possuindo uma diversa gama de hospedeiros detectados nesta região. No Sudeste, são relatados surtos frequentes da zoonose viral emergente causada pelo VACV, a VB, que acomete principalmente bovinos e ordenadores (OLIVEIRA *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008; LOBATO *et al.*, 2005; MADUREIRA, 2009; KROON *et al.*, 2011).

No estado de Minas Gerais os primeiros surtos de VACV foram identificados na Zona da Mata, no ano de 2000. A partir de então, vários surtos foram reportados em várias regiões do estado, sendo elas Vale do Rio Doce, região metropolitana de Belo Horizonte, Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba, Sul/Sudoeste de Minas, Zona da Mata, Campo das Vertentes e Vale do Mucuri. Vale ressaltar que na região do Serro- MG existe circulação dos dois tipos virais Grupo I e II (LOBATO *et al.*, 2005; MADUREIRA, 2009; KROON *et al.*, 2011).

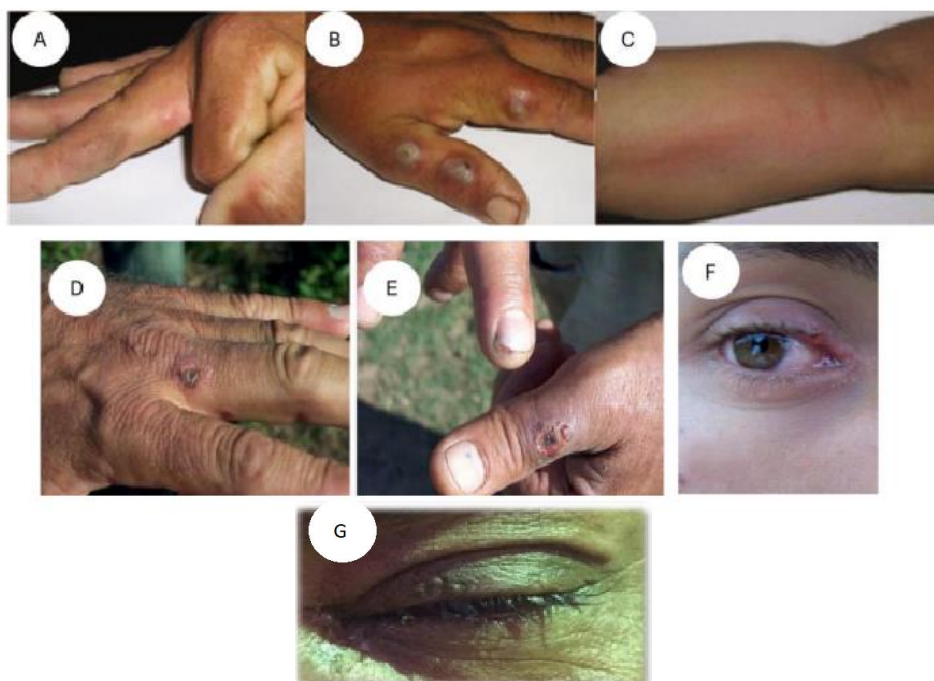
1.3.2 Infecção pelo VACV: Características clínicas da doença e a excreção do vírus através do leite e fezes.

Como já discorrido anteriormente, a doença acarretada pelo VACV é denominada VB. Nos humanos, as lesões são comumente observadas nas mãos e dedos mas também podem ser observadas em outras regiões do corpo, como nariz, região ocular, boca e genitálias pelo processo de auto inoculação (LOBATO *et al.*, 2005; MEGID *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2015; PERES *et al.*, 2016, TRINDADE *et al.*, 2009, TRINDADE *et al.*, 2016; MADUREIRA, 2009; SCHATZMAYR *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

No que tange à evolução clínica a VB é similar entre homens e animais acometidos. Trindade e colaboradores (2009), descreveram a evolução clínica de uma infecção primária causada pelo VACV em humanos. A princípio, foi possível observar o surgimento de máculas e pápulas seguidas por edema e dor local. Posteriormente, surgem vesículas que, em cerca de 3 a 4 dias, evoluem para pústulas umbilicadas envoltas por tecido inflamatório e úlceras com tecido enegrecido, como pode ser observado na figura 10. Em determinados casos, também é possível notar a linfadenopatia periférica (TRINDADE *et al.*, 2009). São frequentemente observadas durante a evolução clínica da VACV em humanos queixas de mialgia, cefaleia e

artralgia, além de linfadenopatia axilar, cervical e inguinal, assim como anorexia (TRINDADE *et al.*, 2003a; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2008; SCHTZMAYR *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2015).

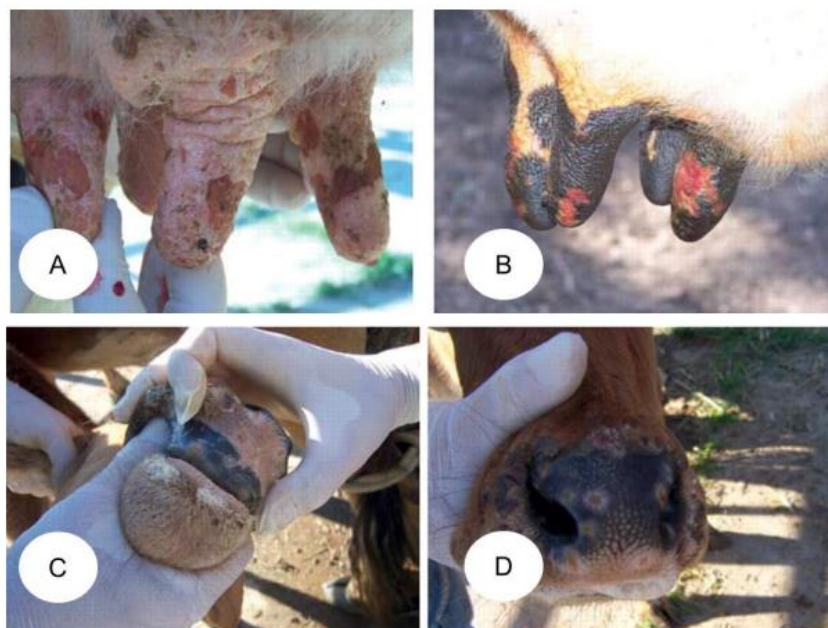
Figura 11 – Lesões causadas pelo VACV em humanos



Em A, B e C é possível observar a evolução de lesões no mesmo ordenhador de 30 anos: pápula (A) e lesões ulcerativas (B) e linfangite periférica (C). Em D, E e F podem ser observadas lesões nas mãos (D e E) e olho (E) em outros ordenhadores. Fonte: TRINDADE *et al.*, 2009; MEGID *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2018.

Nos bovinos acometidos, podem ser observadas lesões nos tetos e úberes como mostra a figura 12. A presença das lesões nos tetos, podem favorecer o estabelecimento de infecções secundárias, como mastites bacterianas, causando redução de até 50% na produção de leite do animal acometido (LOBATO *et al.*, 2005; MADUREIRA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2013; ASSIS *et al.*, 2013). Nos bovinos, as infecções variam de relativamente benignas a graves, sendo que os animais mais jovens apresentam maior morbidade. Comumente os bezerros são infectados durante a amamentação e apresentam lesões no focinho, gengiva e mucosa oral como podemos observar na figura 11 (LEITE *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2017; MATOS *et al.*, 2018).

Figura 12 – Lesões causadas pelo VACV em bovinos



A e B é possível observar lesões nos tetos de vacas em lactação, em C lesões na cavidade bucal e em D no focinho de um bezerro de 6 meses de idade. Fonte: MEGID et al., 2008.

Nos focos de VB, é possível observar a rápida disseminação da doença nas propriedades. Além desta rápida disseminação, investigações sorológicas realizadas com bovinos de áreas endêmicas para VACV demonstraram a circulação silenciosa do vírus, uma vez que, mesmo não sendo observada a doença clínica nos animais, estes ensaios demonstram o contato prévio dos animais com o vírus (BORGES *et al.*, 2017).

No contexto das práticas de manejo, estudos apontam episódios de surtos de VACV tanto em propriedades que empregavam o método manual quanto o mecânico no processo de ordenha. Ao longo destes 20 anos de emergência da VB no estado de Minas Gerais, estudos foram conduzidos em diversas bacias leiteiras (BORGES *et al.*, 2017, TRINDADE *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram uma taxa de acometimento da VB nos animais em lactação entre 25 e 30% na ordenha mecânica, enquanto em propriedades com ordenha manual, a porcentagem de animais acometidos foi entre 80 e 100%. Entretanto, nestes estudos a grande maioria das fazendas amostradas apresentavam ordenha manual (LOBATO *et al.*, 2005; MADUREIRA, 2009; ASSIS *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2017). Ademais, somente vacas em lactação e bezerros amamentando em vacas doentes foram acometidas (LOBATO *et al.*, 2005; MADUREIRA, 2009).

Apesar dos vários casos ocorridos no estado, a doença muitas vezes não é notificada. O acometimento de pequenas propriedades rurais e de precário acesso médico, além da falta de

conhecimento dos profissionais de saúde sobre a VACV favorece a subnotificação dos casos (TRINDADE *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Apesar da VB ser uma doença zoonótica amplamente difundida pela região do Serro-MG, estudos realizados por Oliveira *et al.* 2017 demonstraram que 43,1% dos profissionais de saúde da região nunca ouviram falar sobre a doença, não conhecendo os sinais e sintomas clínicos da infecção ocasionada por esse vírus. Este fato nos sugere que os profissionais de saúde da região não estão preparados para lidar com indivíduos afetados durante surtos de VB, o que pode acarretar uma difusão cada vez maior da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Além da falta de conhecimento tanto por parte dos profissionais da saúde quanto dos produtores, é sabido que durante os surtos de BV, a ordenha é continuada e os produtos frutos dela, comercializados normalmente, apesar do potencial de transmissão do VACV através do leite e produtos lácteos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A presença de DNA de VACV e partículas virais infecciosas no leite de vacas lactantes infectadas criou pelo menos duas hipóteses. A contaminação por vírus pode ocorrer a partir de lesões exantemáticas e crostas presentes nas tetas de vacas que poderia se soltar durante a ordenha; ou pode ser originado de uma infecção sistêmica associada à viremia, dada a proximidade relação entre a produção de leite e o suprimento de sangue em a glândula mamária.

Oliveira e colaboradores, 2015, demonstraram que vacas experimentalmente infectadas com VACV apresentaram excreção do vírus através do leite durante todo o curso clínico da doença, desde o estágio inicial correspondente a presença de ulceração nos tetos, até o período pós cicatrização das lesões, demonstrando a infecção persistente deste vírus.

Deste modo, o estudo demonstrou que os bovinos experimentalmente infectados excretam intermitentemente o vírus desde o primeiro dia pós infecção até os 81º pós infecção, independentemente do método pelo qual este leite foi coletado, seja manualmente ou através da introdução de um cateter no óstio mamário, método o qual, a obtenção de leite ocorreu de maneira direta da glândula mamária sem contato com as lesões e crostas presentes no epitélio do teto. Os autores demonstraram a detecção de DNA do VACV no leite obtido utilizando o cateter, e em momentos em que as vacas não apresentavam lesões nos tetos, sugerindo que a presença de VACV no leite pode ser associada a uma infecção viral sistêmica, devido à viremia, como observado por Rivetti *et al.*, 2013.

Rivetti *et al.*, 2013 demonstraram em seus estudos a detecção do VACV em amostras de sangue e fezes coletadas durante 67 dias pós-infecção. Em seus achados, estes autores detectaram o DNA no sangue e nas fezes desses animais de forma intermitente, mesmo após a resolução das lesões. Eles demonstraram ainda a detecção e quantificação nos linfonodos

mesentéricos e retromamários, íleo, baço e fígado destes animais. A detecção do DNA do VACV nas fezes por um longo período (até 67 dias pós infecção) e nos órgãos linfáticos fornece evidências sobre a eliminação do VACV e sugere que a infecção pelo VACV pode ser uma infecção sistêmica com curso crônico e disseminação viral pelas fezes. Além dos achados de Rivetti e colaboradores, outros estudos como os conduzidos por Iketani e colaboradores em 2002, demonstram infecção persistente em bovinos infectados com parapoxvírus (IKETANI *et al.*, 2002).

1.3.3 VACV: Vias de infecção

A falta de compreensão acerca da disseminação e propagação do VACV é em áreas endêmicas, levanta uma questão: porque a prevalência de anticorpos é notavelmente elevada em humanos, bovinos e outras espécies animais em regiões onde ocorreram surtos de VB, mesmo quando não há a doença clínica, ou seja, durante a circulação silenciosa deste vírus.

Como já descrito anteriormente a VACV é caracterizada como uma zoonose ocupacional, pois a transmissão entre animais e seres humanos ocorre principalmente durante o processo de ordenha, através do contato direto com animais infectados. Contudo, diversos estudos apontam outras vias alternativas de transmissão para esse vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2017; REFELD *et al.*, 2017, OLIVEIRA *et al.*, 2015, RIVETTI *et al.*, 2013).

No que tange a transmissão entre os animais, estudos demonstram que a prática da administração de hormônio injetável (ocitocina) para estimular a ejeção do leite pode ser um fator de transmissão do vírus entre os animais (BORGES *et al.*, 2017). Essa circunstância decorre da reutilização de agulhas entre os animais, o que induz a oportunidade de contaminação de frascos com várias doses do hormônio utilizado, o que pode servir como um fômite para infecção por VACV. Borges *et al.*, 2017, demonstraram em seus estudos a correlação entre o uso de hormônios e consequentemente reutilização de seringa a elevada exposição ao VACV, explicando a elevada soroprevalência anti-OPXV observada em seus estudos. Neste mesmo estudo, os autores inferem que seria possível que essa exposição a baixa carga viral por esse tipo de fômite, poderia contribuir ainda para que os animais mesmo infectados não apresentassem o quadro clínico da doença, o que explicaria a alta soroprevalência em alguns rebanhos, mesmo na ausência de surtos de VB, proporcionando assim para esses animais uma proteção contra casos graves da doença.

No que tange a contaminação de humanos, estudos conduzidos por Costa e colaboradores avaliaram a soroprevalência de anticorpos anti-OPXV em 241 indivíduos na região rural do Serro-MG. Em seus achados, os autores detectaram uma positividade de 30,1% entre a população rural analisada. Dentre esses indivíduos com anticorpos anti-OPXV, 9,5% não haviam sido vacinados contra a varíola. Estes estudos demonstraram ainda a presença de DNA e altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPXV no sangue de indivíduos que não praticam qualquer atividade clássica de exposição ao VACV como a ordenha de bovinos (COSTA *et al.*, 2015). Tais indivíduos com altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPXV no entanto, informaram serem consumidores assíduos de leite cru e queijo, demonstrando assim um possível papel do consumo desses alimentos como rota alternativa de transmissão do VACV (COSTA *et al.*, 2015; 2016).

Apesar da VB ser considerada classicamente uma zoonose ocupacional, pesquisas revelam indícios de contágio em indivíduos que não mantêm contato direto com bovinos, mas compartilham o mesmo núcleo familiar de pessoas que mantêm tal contato (ASSIS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015). Em relação à transmissão do VACV no ambiente intrafamiliar, estudos procuram compreender o papel do consumo de leite cru e seus derivados como rotas alternativas de transmissão. Isso porque partículas de VACV foram isoladas do leite de bovinos infectados e de animais com ou sem sinais de infecção em fazendas sem relatos prévios de surtos de VB (ABRAHÃO *et al.*, 2009b; REHFELD *et al.*, 2017).

Estudos conduzidos por Rehefeld e colaboradores (2017), demonstraram que partículas de VACV viáveis foram detectadas em leite experimentalmente infectado, mesmo após este produto ser submetido a diferentes tempos e temperaturas e até mesmo queijos submetidos ao processo de maturação por até 60 dias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; REHFELD *et al.*, 2017). Oliveira e colaboradores (2017), demonstraram a detecção de DNA do VACV em queijos artesanais comerciais no Brasil. Do mesmo modo, estudos anteriores também analisaram a viabilidade viral em leite contaminado experimentalmente e seus derivados, demonstrando que consumo de queijo artesanal já foi identificado como uma possível nova via de transmissão do VACV, como discutido durante um surto do vírus buffalopox na Índia (GURAV *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2015). Estes achados reforçam a hipótese de que o leite e seus derivados podem estar relacionados a uma nova rota alternativa de transmissão do VACV, sendo, portanto, um potencial risco para a saúde pública humana.

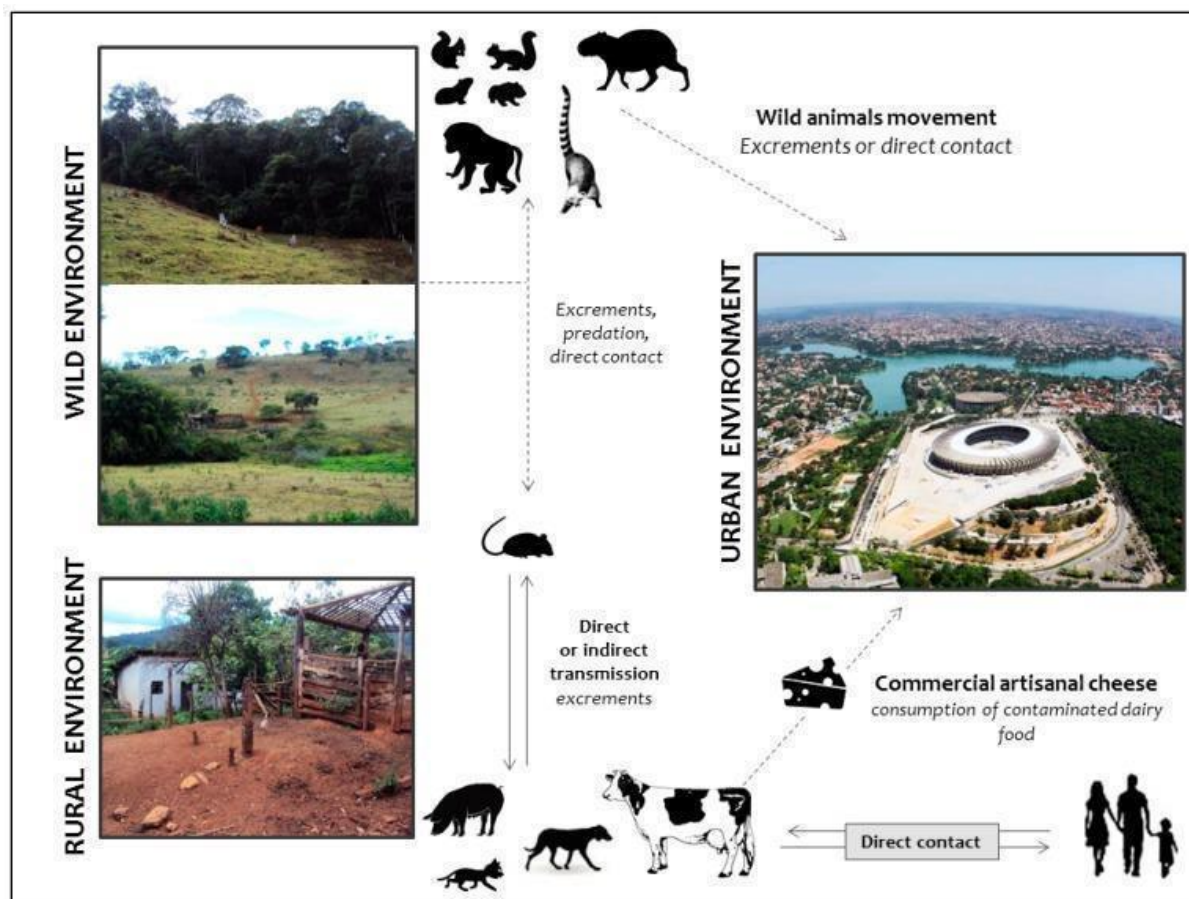
Mas nem só para a população humana essas possíveis rotas de transmissão apresentam um risco potencial. Elas podem ser de extrema relevância para a transmissão do vírus e sua disseminação de maneira geral. Isso porque, estudos demonstram que camundongos

alimentados com queijo produzidos a partir de leite experimentalmente infectado com VACV não apresentaram sinais clínicos de infecção, no entanto, apresentam sinais histopatológicos e anticorpos neutralizantes contra OPXV detectados, além da possível detecção do DNA viral em amostras de órgãos como fígado, fezes e sangue (REHFELD *et al.*, 2015).

Compreender o papel da estabilidade de partículas infecciosas de VACV e DNA são de extrema importância no que tange a manutenção ambiental. Abraão *et al.*, 2009, demonstraram a estabilidade duradoura do VACV nas fezes murinas de camundongos experimentalmente infectados por via intranasal e reforçando a ideia de que a matéria fecal pode representar uma fonte potencial de vírus circulante entre roedores. Todavia, na atualidade existem poucos dados disponíveis a respeito das vias de excreção dos poxvírus, e ainda permanece desconhecida a importância da via de transmissão horizontal do VACV (TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2008).

Assim, a propagação e manutenção de partículas infecciosas na natureza representam um grande desafio para os pesquisadores que visam solucionar ou pelo menos minimizar esta circulação (MAIBORODA, 1982). Oliveira e colaboradores (2017), descreveram algumas destas possíveis rotas de infecção pelo VACV. Em seus estudos, os autores sugeriram a participação de muitos outros hospedeiros na cadeia de transmissão do VACV bem como formas adicionais de transmissão zoonótica deste vírus, tanto no ambiente rural quanto urbano.

Figura 13 – Rotas hipotéticas e reportadas de transmissão do VACV



A imagem, demonstra a participação de diversos grupos de animais em diferentes ciclos de manutenção da VB, sendo a transmissão entre ambientes rurais, silvestres e urbanos. A transmissão ocorre por diferentes vias, sendo elas através de excretas, predação, contato direto entre animais e consumo de produtos lácteos. Fonte: OLIVEIRA et al., 2017.

Estudos realizados com *Mus musculus* (camundongos Balb/c) experimentalmente infectados, sugerem que as fezes possam ser relevantes para a circulação viral entre roedores. Ferreira e colaboradores (2008), demonstraram que camundongos sentinelas expostas às excretas contaminadas com VACV se infectaram e eliminaram partículas e DNA viral em suas fezes, por pelo menos 30 dias pós-infecção. Cargnelutti e colaboradores (2012), utilizaram amostras isoladas de VACV durante um surto envolvendo somente equinos com lesões cutâneas graves, inoculando coelhos brancos da Nova Zelândia, como resultado detectaram o DNA nas fezes desses animais em dias alternados durante 30 dias.

Outros estudos também evidenciaram a excreção viral nas fezes para hospedeiros infectados por outros OPXV como o CPXV, MPXV, e o ECTV (GLEDHILL, 1962; MAIBORODA, 1982, WALLACE & BULLER, 1985; HUTSON *et al.*, 2009). Em um estudo sobre vias de excreção com OPXV realizado por Martina e colaboradores (2006), os autores demonstraram que o vírus estava se espalhando ativamente na população de ratos marrons

selvagens e que possivelmente estes foram os responsáveis por infectar macacos em cativeiro, demonstrando que os primatas não humanos também poderiam servir de hospedeiro para este vírus na natureza.

Maiboroda, em 1982, em estudos com os roedores *Rattus norvegicus* observaram uma alta de morbidade e mortalidade pós infecção. Contudo, os animais sobreviventes, permaneceram eliminando o vírus nas fezes, por mais de 30 dias, comprovação esta realizada através da observação de lesões hemorrágicas em membranas corioalantóides, após a inoculação do material biológico em ovos embrionados de galinha.

Estudos mais recentes realizados por Abrahão e colaboradores (2009), demonstraram que as partículas infecciosas do VACV foram detectadas nas fezes de camundongos infectados por via intra nasal, expostos à temperatura e umidade do ambiente, por 20 dias após a exposição ambiental, enquanto o DNA viral foi detectado até 60 dias após a exposição ambiental, reforçando a ideia de que a matéria fecal pode representar uma fonte potencial de vírus circulante entre roedores.

Do mesmo modo, estudos conduzidos por D'Anunciação e colaboradores (2012) em modelo murino, detectaram partículas infecciosas nas fezes de camundongos que se infectaram a partir do contato com fezes bovinas contaminadas. Este estudo, em particular, demonstra que se o modelo de transmissão realizado puder ser aplicado a ambientes naturais, a exposição a fezes bovinas pode ser considerada um fator de risco para a disseminação do VACV; consequentemente, o uso tradicional de esterco bovino como fertilizante em atividades agrícolas pode estar promovendo a infecção de roedores e estes por sua vez poderiam disseminar o vírus para outros mamíferos no ambiente silvestre.

1.3.4 Importância das espécies silvestres na disseminação do VACV

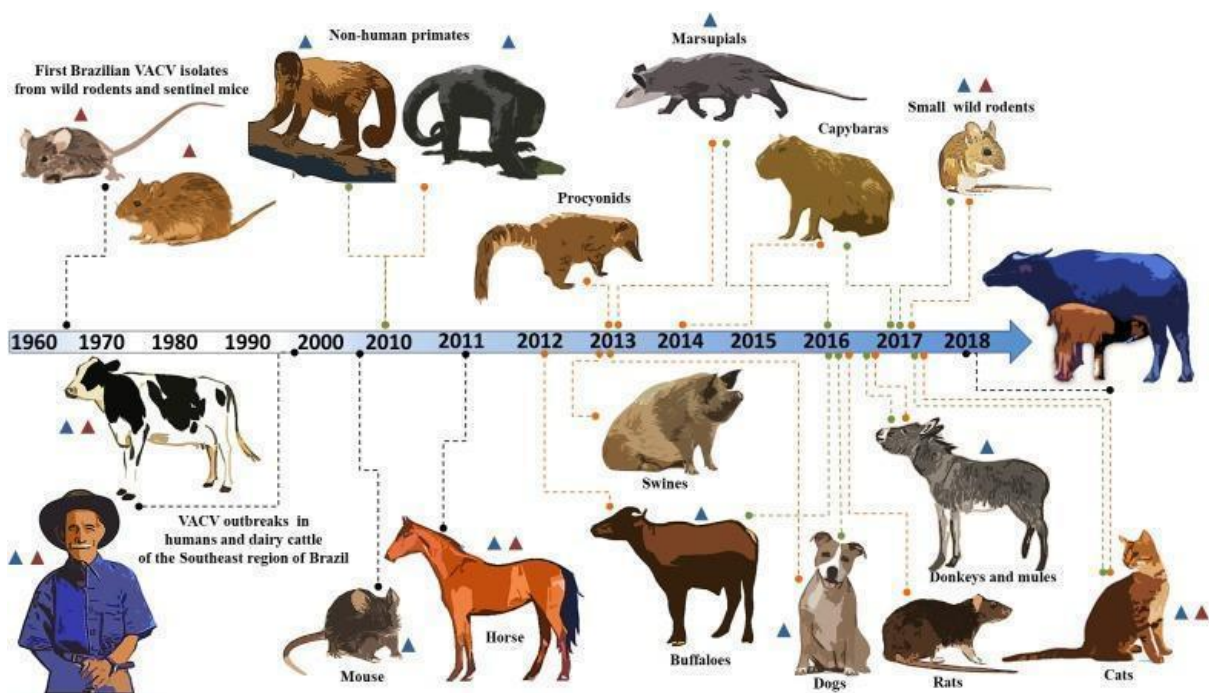
Não obstante tenham decorrido mais de duas décadas desde a emergência do VACV no Brasil, investigações persistem no propósito de alcançar uma compreensão aprofundada e esclarecedora das espécies que participam ativamente na cadeia de transmissão deste vírus, assim como de sua dinâmica de manutenção na natureza. O escopo desses estudos abrange análises desde as interações ecológicas, fatores ambientais e características biológicas associadas ao VACV, buscando elucidar não apenas os vetores diretos, mas também os mecanismos subjacentes à persistência do vírus no ambiente natural. Estudos que visam preencher e elucidar estas lacunas vêm sendo intensificados nas últimas décadas, principalmente a partir do ano 2010 (FONSECA *et al.*, 2011; DOMINGOS *et al.*, 2022; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). Assim, vários estudos demonstraram evidências moleculares e sorológicas da

circulação do VACV entre as espécies silvestres confirmando o amplo espectro de hospedeiros já propostos do VACV (LIMA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2008).

Estudos conduzidos por Miranda e colaboradores (2017) e Martins da Costa e colaboradores (2020), identificaram a presença de anticorpos anti-OPXV e/ou DNA do VACV em pequenos mamíferos residentes em ambientes silvestres. Entre as espécies avaliadas incluíam-se roedores, marsupiais e quirópteros, o que corrobora a hipótese de que mamíferos selvagens constituem possíveis reservatórios naturais do VACV, desempenhando, dessa forma, um papel ativo na sua cadeia de transmissão. Além dos estudos anteriormente mencionados, Peres e colaboradores (2018), realizaram a detecção molecular do gene vgf em marsupiais que habitam ambientes silvestres, evidenciando, desta forma, a possível presença e circulação do VACV nesse cenário natural. Essa descoberta contribui para a crescente compreensão da ecologia do VACV e reforça a ideia de que a interação entre o vírus e a fauna silvestre pode desempenhar um papel relevante na dinâmica de transmissão do vírus fora do contexto agrícola e pecuário.

Em seu trabalho, Lima e colaboradores (2019), delinearão a história natural do VACV no contexto brasileiro ao longo do tempo, fundamentada na descrição de novos hospedeiros para este vírus. Este estudo destacou a detecção do VACV em animais silvestres, proporcionando uma compreensão mais abrangente e detalhada da ecologia do vírus e de sua possível disseminação em populações não domesticadas.

Figura 14 – Linha do tempo identificando novos hospedeiros do VACV no Brasil



As linhas laranja e verde indicam evidência sorológica e molecular, respectivamente. As linhas pretas indicam isolamento viral. Os triângulos azuis e vermelhos representam a circulação do VACV GI (grupo I) e VACV GII

(grupo II), respectivamente. Os anos para cada estudo são indicados ao longo da linha do tempo. Fonte: Lima et al., 2019.

Roedores e marsupiais têm sido alvo de significativa atenção em pesquisas voltadas para a compreensão do papel desempenhado por animais silvestres na disseminação do VACV na natureza. Tal destaque decorre da possibilidade de que o contato dessas espécies com as fezes de bovinos infectados em ambientes peridomésticos propicie a sua própria infecção. Esses animais, por conseguinte, poderiam assumir a função de disseminadores do VACV no ambiente silvestre, contribuindo para a complexidade da dinâmica de transmissão do vírus nesse contexto específico (ABRAHÃO *et al.*, 2009; D'ANUNCIACÃO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Contudo, para além dos roedores e marsupiais, investigações têm sido conduzidas visando elucidar a contribuição de outras espécies animais silvestres no referido processo de disseminação do vírus.

Abrahão e colaboradores (2010), conduziram uma pesquisa em uma região de transbordamento no estado do Tocantins, com o objetivo de avaliar a propagação do VACV entre animais silvestres. Tal iniciativa foi motivada pela observação de que estudos preexistentes se limitavam à descrição da circulação do VACV em sua maioria entre roedores silvestres. No presente estudo, foram avaliados macacos-prego, macacos-pretos quatis, cutias, gambás, tatus, tamanduás e raposas cinzentas. Vale ressaltar que todos os animais capturados não mantiveram contato prévio com indivíduos humanos ou gado leiteiro. Diante da extensa gama de animais silvestres analisados, os pesquisadores demonstraram uma soroprevalência significativamente elevada de anticorpos anti-OPXV nos primatas não humanos analisados. Em seus resultados observou-se uma soroprevalência de 4,1% em macacos-prego e de 25,9% em macacos-pretos.

Os achados de Abrahão e colaboradores (2010), suscitam a possibilidade de que outras espécies animais, para além dos roedores, possam desempenhar um papel relevante na manutenção do VACV no ambiente silvestre. Especificamente, destacam-se os primatas não humanos como potenciais contribuintes para a dinâmica de persistência do VACV no cenário silvestre.

1.4 Produção de leite e derivados no estado de Minas Gerais

A atividade leiteira representa um elemento de extrema importância no contexto do agronegócio brasileiro, destacando-se o estado de Minas Gerais como o mais proeminente em termos de volume de produção, ocupando a posição de liderança entre as diversas unidades federativas do país. A trajetória da produção de leite nesse estado remonta ao período colonial brasileiro e mantém-se vigente até os dias atuais, situando-se como a mais significativa em

escala nacional (DA SILVA FILHO & FIGUEIRA, 2019).

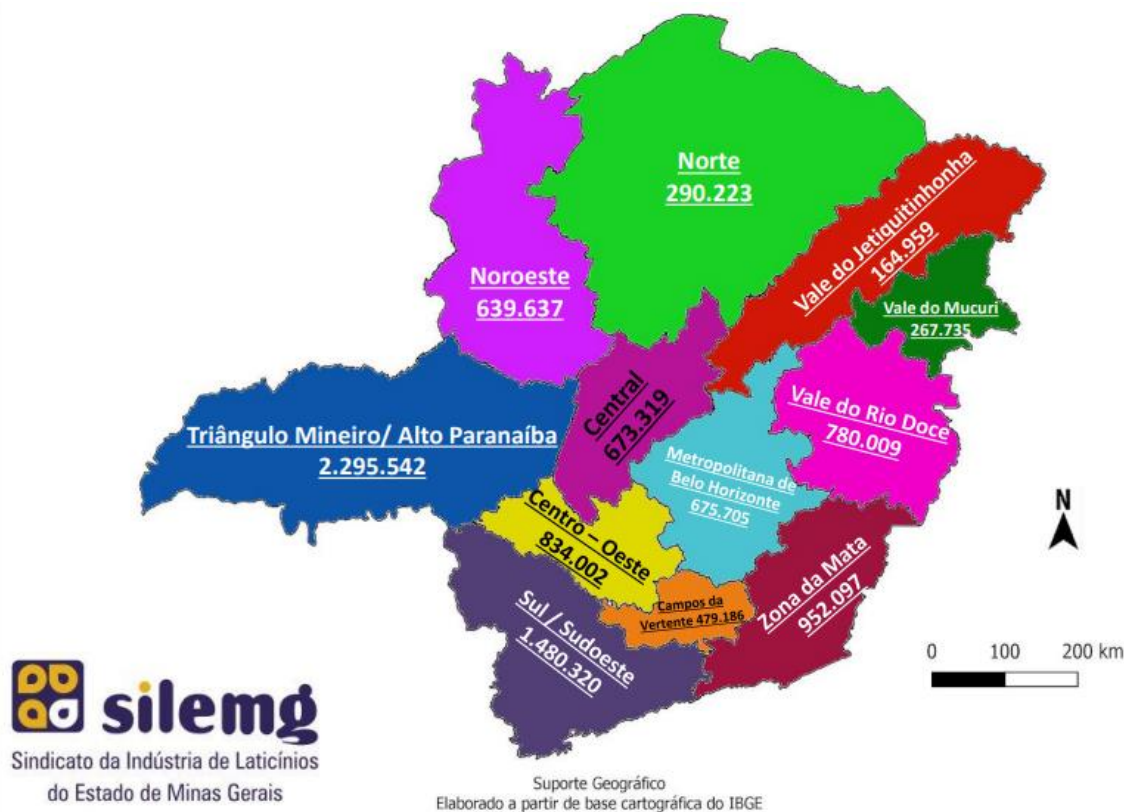
Além da atividade primária de produção de leite, o estado de Minas Gerais se destaca como a principal região produtora de produtos lácteos no contexto nacional. No ano de 2015, sua participação na produção total do país alcançou expressivos 26,1%. Uma análise mais detalhada da distribuição geográfica dessa produção revela uma notável heterogeneidade espacial (LEMOS *et al.*, 2003; PEROBELLI, ARAÚJO JUNIOR, CASTRO, 2018; ALVES & GALDONFI, 2023).

Dados mais recentes, demonstram que no ano de 2020, o Estado de Minas Gerais desempenhou um papel preponderante na produção nacional de leite, respondendo por 27,345% do total, conforme dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Essa expressiva contribuição consolidou sua posição como o principal produtor entre os estados, totalizando 9,69 bilhões de litros de leite. Além da contribuição quantitativa, Minas Gerais sobressaiu ao apresentar o maior valor agregado ao produto. No referido ano, a produção leiteira contribuiu significativamente para a arrecadação estadual, totalizando 16,0 bilhões de reais, representando um incremento de 38,9% em relação ao exercício anterior. Esses resultados ressaltam a posição proeminente do estado não apenas no contexto da produção leiteira em volume, mas também na geração de valor econômico associado a esse importante segmento agroindustrial (IBGE, 2020; EMBRAPA, 2021).

Tabela 3 – Participação do estado de Minas Gerais liderando o ranking de maior produtor de leite do Brasil nos anos de 2019/2020

ESTADOS	VOLUME ADQUIRIDO (BILHÕES LITROS)		VARIAÇÃO (MILHÕES LITROS)	PARTICIPAÇÃO (%)
	2019	2020	2020/2019	2020
Minas Gerais	6,285	6,509	224	25,5
Paraná	3,308	3,480	173	13,6
Rio Grande do Sul	3,255	3,317	62	13,0
Santa Catarina	2,761	2,884	124	11,3
São Paulo	2,786	2,728	-58	10,7
Goiás	2,636	2,500	-137	9,8
Rondônia	0,620	0,636	16	2,5
Bahia	0,462	0,565	103	2,2
Rio de Janeiro	0,524	0,507	-17	2,0
Mato Grosso	0,506	0,480	-26	1,9%

Figura 15 – Mapa da produção leiteira do estado de Minas Gerais



Mapa indicando os valores da produção em mil litros de acordo com cada região geográfica. Fonte: IBGE, 2021.

Conforme a Pesquisa Trimestral do Leite, realizada e divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os dados indicam que aproximadamente 72,2% da produção leiteira, equivalente a 25,6 bilhões de litros, foi comercializada por estabelecimentos com inspeção sanitária. Essa proporção sugere que essa parcela do produto foi submetida a algum processo de industrialização. Os restantes 27,8% da produção foi destinada ao consumo interno das famílias produtoras e comercialização direta ao consumidor final, sem passar por qualquer tipo de tratamento ou processamento térmico. Ainda de acordo com o instituto, o valor médio pago aos produtores pelo litro do leite registrou um aumento significativo de 28,9% no ano de 2020, atingindo a marca de R\$1,59 por litro. Esse incremento resultou em um aumento de 30,8% no valor total da produção leiteira no estado, alcançando R\$56,5 bilhões em comparação com o ano de 2019. Tais dados refletem a relevância substancial desse produto para a economia do estado (IBGE, 2021).

Diante desse contexto, é possível inferir que o VACV pode exercer influência sobre a produção de leite no estado, tanto por meio direto no que tange a atividade leiteira, como também pelo impacto que exerce nas comunidades consideradas vulneráveis. Essa constatação denota a complexidade dos fatores interligados entre a presença do VACV, a produção leiteira e as populações suscetíveis, destacando a necessidade de uma abordagem abrangente na análise

dos impactos desse vírus sobre a economia agrícola e a saúde pública no referido estado (LOBATO *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, KROON *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2018). Em virtude da limitada compreensão por parte dos produtores acerca da doença e da inexistência de exames específicos para o diagnóstico preciso do agente etiológico responsável pelas lesões em bovinos, a enfermidade frequentemente passa despercebida ou é incorretamente categorizada como mastite (COSER, LOPES & COSTA, 2012).

A mastite é caracterizada como um processo inflamatório da glândula mamária e, etiologicamente, representa uma doença complexa de natureza multifatorial, envolvendo diversos patógenos, assim como fatores ambientais e intrínsecos ao animal (COSER; LOPES & COSTA, 2012). Diversos estudos evidenciam que a mastite pode resultar em perdas de até 70% na produção de leite (SANTOS, 2012). Nesse contexto, presume-se que uma porção significativa dessas perdas possa ser atribuída à VB, particularmente em regiões produtoras de leite onde a presença do VACV já foi detectada (LOBATO *et al.*, 2005).

1.5 Queijo Minas, patrimônio cultural e fonte de renda dos mineiros

Em virtude da extensa produção de leite no estado de Minas Gerais, este também emergiu como um relevante produtor de queijo. Historicamente, o setor pecuário no Brasil experimentou um período de notável expansão durante o auge dos engenhos de açúcar e da exploração mineral. Contudo, foi somente a partir do século XVIII, com o surgimento de povoados que apresentavam condições propícias, como altitude e clima favorável, que a produção queijeira alcançou seu desenvolvimento substancial (NETTO, 2014).

A produção histórica de queijo em Minas Gerais ocorreu concomitantemente à colonização da capitania e à atividade de mineração do ouro. Neste contexto, os registros contidos na historiografia colonial brasileira, relacionados à história da pecuária durante o período de colonização dos sertões, fornecem dados e informações históricas pertinentes à produção e consumo de queijos artesanais na região da antiga capitania de Vila do Príncipe, correspondente ao atual município de Serro em Minas Gerais (NETTO, 2014; MENESES, 2000).

A produção de queijo na então capitania de Vila do Príncipe foi, predominantemente, motivada pela dificuldade de escoamento da produção de leite nas propriedades da região. Diante dessa circunstância, a abundante quantidade de leite gerada nas fazendas necessitava de uma aplicação e, conseqüentemente, passou a ser empregada na fabricação de queijos artesanais. Em razão da considerável escala de produção em comparação ao consumo local, essa prática deu origem aos queijos maturados, uma vez que parte significativa da produção não era consumida e comercializada de imediato. Essa transição na produção de queijos reflete

a necessidade de gerenciar o excedente de leite de maneira prática e econômica na região histórica da capitania de Vila do Príncipe (NETTO, 2014).

A produção se intensificou e se tornou ainda maior após o esgotamento da mineração no estado. A escassez resultante da exaustão da mineração, que até então constituía a principal fonte econômica regional, incentivou a ampliação da produção de queijo como uma nova fonte de renda. Por este motivo, as fazendas começaram a produzir o queijo em escalas cada vez maiores e o “Queijo Minas” se tornou uma das atividades para diversificar a economia mineira se tornando mais que um produto, uma tradição que perdura até os dias atuais (FONSECA, 2011; NETTO, 2014).

Figura 16 – Instrumentos utilizados para fabricação de queijo minas artesanais



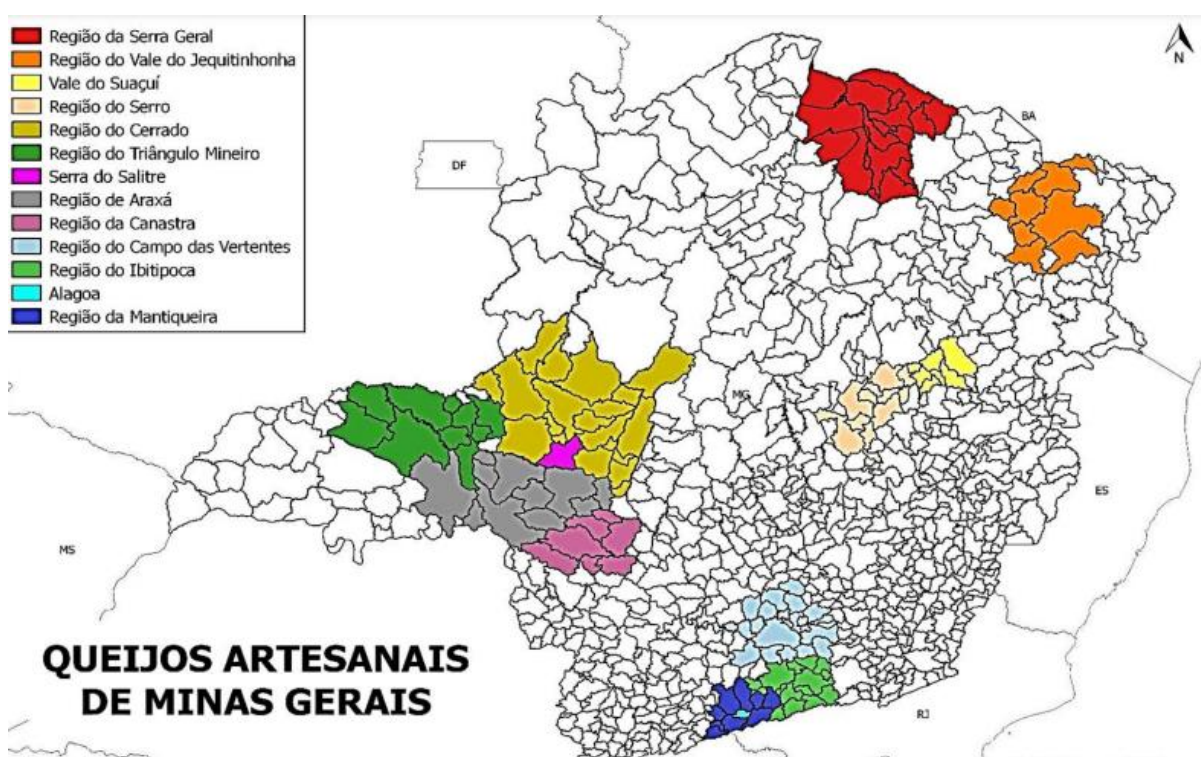
Acervo presente no museu do queijo na cidade do Serro em Minas Gerais. Fonte: IEPHA, 2016.

Dados recentes referentes ao ano de 2020 indicam que o Brasil registrou uma produção total de 1,2 milhão de toneladas de queijo, conforme informações fornecidas pelo Sindicato da Indústria de Laticínios de Minas Gerais (Silemg). Desse volume, 40% originaram-se do estado de Minas Gerais. Além da distribuição nacional, uma parcela significativa dessa produção foi destinada ao mercado internacional, contribuindo para as exportações brasileiras de queijo que, no mesmo ano, geraram uma receita total de 76 milhões de dólares. Esses dados evidenciam a relevância da produção queijeira brasileira, particularmente destacando a significativa contribuição do estado de Minas Gerais para esse cenário (SILEMG, 2022; EMATER-MG,

2022).

Originário da fabricação caseira, o queijo Minas é atualmente um dos queijos mais produzidos comercialmente (FERREIRA *et al.* 1992; MONTEIRO & DA MATTA, 2018). O renome do "Queijo Minas" não se estabeleceu ao acaso, mas devido à qualidade e sabor frente aos demais tipos de queijos produzidos no Brasil. Graças ao apelo regional que carrega consigo e por ser um importante ingrediente gastronômico das receitas tradicionais da culinária mineira, sua característica como importante fonte nutricional, em qualquer fase da vida, tornou-se um elemento parte da alimentação do brasileiro (MONTEIRO & DA MATTA, 2018).

Figura 17 – Atuais Regiões Produtoras de Queijo Minas Artesanal



Mapa de Minas Gerais indicando as regiões produtoras de queijo artesanal. Fonte: EMATER, 2021.

A produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) a partir de leite cru constitui uma prática tradicional em diversos municípios do estado de Minas Gerais. Essa atividade não apenas desempenha o papel de principal geradora de renda em várias regiões do estado, mas também incorpora consigo uma significativa dimensão de identidade sociocultural. O QMA, além de seu papel econômico, desempenha um papel crucial na preservação e transmissão das tradições locais, refletindo-se como uma expressão tangível da riqueza cultural e histórica deste produto (FURTADO, 1980; DAS DORES & FERREIRA, 2012).

O QMA alcançou mais reconhecimento e destaque com a promulgação da Lei estadual 14.185, datada de 31 de janeiro de 2002, e sua subsequente regulamentação pelo Decreto

estadual 42.645, de 05 de junho de 2002. O primeiro artigo desta legislação estabelece que: “É considerado Queijo Minas Artesanal o queijo que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem” (Lei nº 14.185 de 31/01/2002). Posteriormente substituída pela lei Nº 23157 de 18/12/2018 que dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais.

O QMA voltou a ser destaque após a edição de um dossiê, que tinha como objetivo conceder a este produto o status de patrimônio imaterial do estado, visando sua maior notoriedade e assim sua valorização e atenção ao seu produtor. Este dossiê originou-se na região município do Serro, e posteriormente foi apresentado ao governo mineiro, acarretando uma campanha para que ocorresse o tombamento do QMA, o qual mais tarde foi realizado pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais (IEPHA-MG).

Tendo o município do Serro como exemplo, na sequência, outras regiões também pleitearam o mesmo título estendendo-o para o âmbito nacional, por meio do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN). Mais tarde um feito ainda maior foi alcançado, obtendo o QMA o título de Patrimônio Imaterial na Convenção da UNESCO.

Com a consolidação do QMA na esfera sociocultural e o papel fundamental desempenhado pela região do Serro em sua ascensão nacional, a área conquistou o selo de indicação geográfica. Esse selo, confere uma valorização adicional ao QMA produzido nessa região, ressaltando não apenas a qualidade do produto, mas também a importância das características geográficas e das práticas locais em sua produção. A obtenção do selo não apenas atesta a autenticidade e a tradição associadas a este produto, mas também contribui para preservar suas características vinculadas à sua origem. Além disso, este selo serve como um meio de proteção e promoção, fortalecendo o prestígio do produto e sustentando economicamente a região, enquanto preserva sua herança cultural (NETTO, 2011).

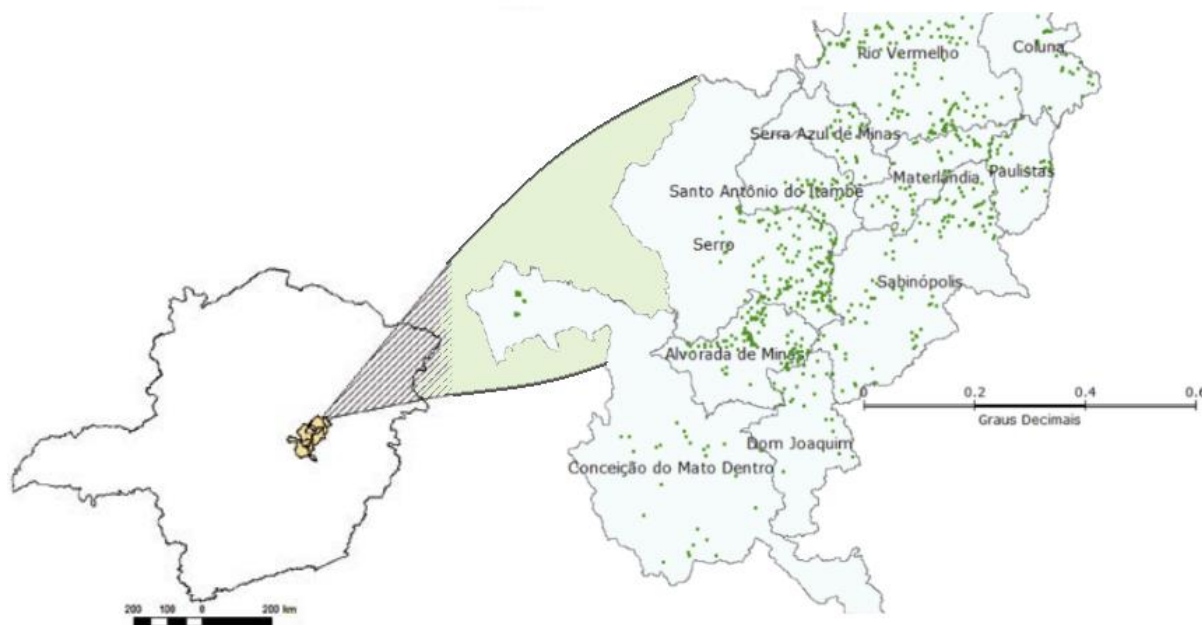
1.5.1 A importância do QMA para a economia da região do Serro-MG

A importância do QMA na economia da região do Serro não é algo recente. Dados históricos como um inventário de uma abastada família do arraial do Tijuco datado de 1793 mostram não só os hábitos de consumo deste produto pela família na referida época, mas demonstra a importância da produção do queijo e sua comercialização na região do Serro já na segunda metade do século XIX (MENESES, 2000). Outras fontes históricas, como o relato de

viagens pelo Brasil do autor Suzannet, no período entre 1842-43, indicam que, na década de 1840, os municípios do Serro e de Conceição do Mato Dentro já eram responsáveis por uma produção significativa de queijo. Este não apenas visava atender à demanda local, mas também abastecer outras localidades mais distantes, incluindo a então capital do Brasil, o Rio de Janeiro (SUZANNET, 1846).

Atualmente, estima-se que o QMA seja produzido em aproximadamente 6.000 propriedades na região do Serro-MG, no entanto, apenas 756 propriedades estão devidamente registradas nesta atividade, sendo localizados nos municípios de Alvoradas de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Coluna e Serro. O município do Serro e os municípios vizinhos possuem na atualidade uma produção média diária de aproximadamente 10.000 queijos, com volume de 110 litros de leite por propriedade (Sertão Brás, 2017).

Figura 18 – Municípios produtores de queijo pertencentes a microrregião do Serro



Mapa indicando os municípios produtores de queijo minas artesanal na microrregião do Serro em Minas Gerais
 Fonte: Modificado de Emater, 2023.

De acordo com dados da Associação dos Produtores Artesanais do Queijo Serro (APAQS) são produzidos cerca de 30.000 litros de leite por dia na região, que são destinados à produção de queijos artesanais. A grande escala de produção é comercializada com o auxílio da Cooperativa dos Produtores, responsável por distribuir o queijo artesanal por todo Brasil. A

cooperativa auxilia na comercialização dos queijos por diversos meios, sendo eles lojas físicas, *e-commerce* e possui ainda um centro de distribuição localizado na Central Estadual de Abastecimento (Ceasa) localizado na cidade de Belo Horizonte-MG, responsável pela ampla distribuição do produto (APAQS, 2017). De acordo com a Prefeitura do município de Serro-MG, o QMA desempenha um papel preponderante na economia local, contribuindo com 60% da renda municipal. Esta atividade gera uma receita diária de 120 mil reais para o município e sua região circunvizinha.

1.5.2 QMA: a preocupação sanitária por trás do processo de produção e o impacto do VACV neste produto

Devido ao seu destaque e pelo inigualável sabor, o QMA passou a ser amplamente difundido pelo país e, atualmente, pode ser adquirido em todos os estados brasileiros e inclusive em outros países ao redor do mundo (ARAÚJO *et al.*, 2020). Com a ampla comercialização do QMA, as autoridades de saúde manifestaram preocupações relacionadas à qualidade do produto. Isso se deve ao fato de que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), resultantes da ingestão de alimentos e/ou água contaminados por microrganismos patogênicos, representam atualmente um dos problemas de saúde pública mais recorrentes no cenário mundial contemporâneo (SVS, 2017).

Dessa maneira, a produção do queijo artesanal, obtido a partir de leite cru, passou a ser sujeita a regulamentações com o objetivo de assegurar um produto seguro para a população. Uma das primeiras iniciativas nesse sentido foi a promulgação da Instrução Normativa N° 57, datada de 15 de dezembro de 2011, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais (BRASIL, 2011).

Devido a algumas lacunas identificadas em seu processo de produção e considerando sua notoriedade a nível nacional, a Secretaria de Estado da Agricultura de Minas Gerais (SEAPA), por intermédio do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER-MG), demandam que os produtores rurais das regiões tradicionalmente produtoras do QMA façam parte do Programa de Melhoria do Queijo Minas Artesanal. Neste contexto, conforme discutido por Santana e colaboradores (2008), em determinados cenários, a obtenção do leite ocorre em condições higiênico-sanitárias precárias, resultando em uma elevada presença de microrganismos. Essa situação configura-se como um risco à saúde pública. Nesse sentido, torna-se indispensável adotar medidas rigorosas de higiene ao longo de todo o processo, desde a etapa de ordenha até a obtenção do produto final, a fim de garantir a segurança sanitária do

leite e de seus derivados.

Este programa, sob a gestão da EMATER-MG, tem como propósito a organização dos produtores com vistas a aprimorar e padronizar seus produtos, alinhando-os às normativas vigentes de produção, higiene e comercialização. Este esforço culmina na elevação da qualidade dos queijos e, por conseguinte, na obtenção de certificação. Adicionalmente, o referido programa busca proporcionar, sobretudo aos pequenos produtores, uma alternativa adicional para a comercialização de seus produtos, resultando em uma valorização agregada e contribuindo para a melhoria da qualidade de vida das famílias produtoras (NETTO, 2011).

Nesse contexto, as Boas Práticas Agropecuárias (BPA) desempenham um papel fundamental ao garantir a adequação e a segurança do leite e seus derivados para o consumo humano. Dentre as medidas indispensáveis, destacam-se a manutenção da sanidade animal, a implementação de práticas higiênicas durante o processo de ordenha, o armazenamento do leite sob condições sanitárias apropriadas, bem como a utilização de equipamentos adequados tanto para a ordenha quanto para o armazenamento do leite. Essas práticas se revelam essenciais para assegurar a integridade e qualidade do produto final, contribuindo, assim, para a preservação da saúde pública (FAO e IDF, 2013).

Essas iniciativas são extremamente relevantes, uma vez que, conforme dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde, produtos lácteos, como o leite e seus derivados, figuram entre os principais alimentos implicados em surtos de DTAs, conforme atestado por um levantamento abrangendo o período de 2007 a 2018. Essa constatação ressalta a importância crítica de se implementar medidas efetivas de controle e segurança ao longo da cadeia produtiva desses alimentos, visando mitigar riscos à saúde pública (SVS, 2017).

Deste modo, o VACV se torna uma fonte de preocupação frente a comercialização e consumo do QMA. Isso porque, Oliveira e colaboradores, em 2017, demonstraram em seus estudos a detecção do VACV em queijos comerciais em um grande centro urbano do país. Rehfeld e colaboradores (2017) também demonstraram a detecção de DNA viral do VACV em queijos maturados experimentalmente infectados pelo VACV, mesmo submetidos à maturação por 60 dias. Outros achados relevantes neste sentido, foram os obtidos pelos estudos conduzidos por Oliveira e colaboradores (2017) que investigaram e quantificaram o DNA do VACV, bem como a presença de partículas virais infecciosas em amostras de coalhada, soro de queijo e leite pasteurizado produzido a partir do leite de vacas inoculadas experimentalmente com VACV. O DNA do VACV foi detectado em amostras de queijo e leite pasteurizado em diferentes momentos, mesmo após a resolução das lesões típicas causadas pelo VACV, que ocorreu após 22 dias pós-infecção, em média. Além disso, foi possível detectar partículas virais infecciosas

em amostras de queijo em dias alternados até 27 dias pós infecção. A presença de DNA do VACV e de partículas virais infecciosas em amostras de queijo ao longo do curso clínico da VB e mesmo após o desaparecimento dos sinais clínicos típicos da doença chama a atenção para o risco associado ao consumo do queijo.

Esses achados são de grande relevância e vão de encontro aos estudos conduzidos por Oliveira e colaboradores realizados em 2013 em que os pesquisadores identificaram a excreção do vírus do VACV até o 81º dia pós-infecção, mesmo na ausência de lesões clinicamente aparentes nos bovinos. Além disso, Rivetti e colaboradores (2013) também documentaram a detecção do DNA do VACV no leite, obtido por meio da utilização de um cateter introduzido na glândula mamária. É relevante destacar que tais detecções ocorreram em momentos nos quais as vacas não apresentavam lesões nos tetos, indicando uma possível associação entre a presença do VACV no leite e uma infecção viral sistêmica. Esses achados contribuem de maneira substancial para a compreensão da dinâmica da disseminação do VACV em bovinos e ressaltam a importância de considerar a excreção viral além do período de manifestação clínica visível.

Nesse contexto, é imprescindível considerar o VACV como um potencial fator de risco para a saúde pública. A razão para tal preocupação incide na possibilidade de QMA e outros derivados lácteos servirem como fonte de transmissão do referido vírus, emergindo como uma via de entrada para infecção em populações urbanas. Diante desse cenário, a avaliação meticulosa da circulação do VACV em regiões dedicadas à produção de queijo e leite assume uma importância crucial no que tange à saúde pública. Esta análise não apenas permite uma compreensão mais abrangente dos potenciais riscos associados à disseminação do vírus por meio de produtos lácteos, mas também sinaliza a necessidade da implementação de estratégias efetivas de controle e monitoramento em ambientes de produção e distribuição desses alimentos. A abordagem proativa e aprofundada dessas questões contribuirá substancialmente para a mitigação do risco de transmissão do VACV e, por conseguinte, para a preservação da saúde pública (REHFELD *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

1.6 Tratamento térmico do leite: Inativação do VACV através do calor

A produção de queijos representa uma das atividades mais significativas dentro da indústria de produtos lácteos. No Brasil, os tipos de queijos mais consumidos incluem os minas frescal e a muçarela, sendo que a fabricação destes se concentra predominantemente em estabelecimentos de pequeno e médio porte localizados nas regiões Sul e Sudeste do país (BARROS *et al.*, 2004). O QMA especialmente o tipo frescal devido a sua elevada umidade e à grande manipulação durante o processo de fabricação e ser elaborado a partir do leite cru

confere ao produto condições propícias para a contaminação, sobrevivência e multiplicação de microrganismos (CÂMARA *et al.*, 2002).

Inúmeros autores têm demonstrado a presença de microrganismos patogênicos em queijos destinados ao consumo, com ênfase especial aqueles produzidos a partir do leite cru, destacando, assim, a relevância do controle da qualidade desses produtos (BORGES *et al.*, 2003; ZAFFARII *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Contudo, é notável a escassez de informações na literatura acerca de doenças virais transmitidas por meio de alimentos lácteos. As infecções virais provenientes da contaminação de produtos lácteos permanecem subestimadas em comparação com os surtos alimentares atribuídos a origens bacterianas (SILVA & LAVINAS, 2010).

De maneira geral, o leite proveniente da glândula mamária de animais saudáveis não abriga microrganismos patogênicos, como bactérias ou vírus prejudiciais à saúde humana. Contudo, em circunstâncias nas quais o animal apresenta uma infecção sistêmica ou intramamária, há a possibilidade de que tais microrganismos sejam excretados concomitantemente ao leite no decorrer do processo de ordenha. (LEJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009). Adicionalmente, é relevante notar que o leite pode sofrer contaminação por meio de fômites durante o processo de ordenha. (OLIVER *et al.*, 2005; LEJEUNE e RAJALASCHULTZ, 2009).

O tratamento térmico demonstra eficácia na inativação de microrganismos, embora sua efetividade varie conforme a resistência de cada agente. Notavelmente, a literatura científica apresenta uma lacuna significativa em relação aos estudos específicos sobre o processamento térmico do leite no que tange aos vírus. Uma das principais técnicas de processamento térmico aplicadas ao leite é a pasteurização, que implica a manutenção do produto a temperaturas entre 62 e 65 °C por um período de 30 minutos. Esse procedimento é habitualmente conduzido em tanques, nos quais o leite é submetido a agitação mecânica ao longo de todo o processo (Brasil, 1952). Embora não seja adotado em escala industrial, este processo pode ser empregado em laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para produção de derivados lácteos, de acordo com a IN 51 de 18 de setembro de 2002 (Brasil, 2002).

Estudos conduzidos por Oliveira e colaboradores (2010), demonstraram que amostras de leite experimentalmente infectados submetidas à pasteurização lenta foram positivas para o DNA de VACV. Os autores demonstraram que a detecção do DNA do VACV no leite se estendeu além do período de resolução das lesões, que ocorreu em média, no 22º dia pós infecção. Os autores demonstraram ainda que foi possível observar um aumento progressivo da concentração do DNA viral nas amostras de leite pasteurizado, sendo alcançada a maior quantificação no 9º dia pós - infecção. A resistência do VACV ao calor foi avaliada por

Sauerbrei e Wutzler (2009). O VACV foi avaliado quanto à sua resistência ao calor seco utilizando um instrumento capaz de emitir calor, o *Keredusy*. O VACV foi resistente ao calor quando exposto durante uma hora às temperaturas 40° C, 75° C, 85° C e 95° C. A redução significativa do título viral (redução de pelo menos 4 log₁₀ o título inicial do vírus) foi observada somente quando exposto à temperatura de 95° C durante duas horas. Em outras faixas de temperaturas, o VACV não sofreu redução do título viral, sendo, portanto, resistente às temperaturas testadas.

Em estudos prévios também conduzidos por Oliveira e colaboradores (2010), os pesquisadores foram capazes de recuperar partículas viáveis de VACV do leite experimentalmente infectado mesmo após ser submetido às temperaturas de 56° e 65 °C durante 30 minutos (OLIVEIRA *et al*, 2010). De acordo com a instrução normativa número 51 do MAPA (Brasil, 2002), a pasteurização lenta pode ser adotada em laticínios de pequeno porte para o abastecimento público ou para a produção de derivados lácteos. Entretanto, a preservação de DNA e partículas virais viáveis no leite, mesmo após a realização de pasteurização em processo lento, suscita a atenção para a potencial transmissão desses agentes, representando um risco à saúde pública. A pasteurização visa eliminar microrganismos patogênicos, como *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*. No entanto, é crucial avaliar sua eficácia na inativação de vírus relevantes para a saúde pública como o VACV (BONA *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Os agentes infecciosos patogênicos que incidem sobre a saúde humana possuem predominantemente origem zoonótica, indicando a transmissão entre animais e humanos. Nesse cenário, destacam-se os ortopoxvírus, devido a sua intensa interação com a espécie humana ao longo da história da humanidade. O VACV é o agente etiológico da VB que faz parte deste grupo de patógenos que incidem na espécie humana há séculos. Estudos demonstram a presença do VACV em diversos países sul-americanos, como Colômbia, Argentina e Uruguai. No entanto, é no Brasil que sua disseminação é mais amplamente observada em uma significativa gama de espécies animais. Apesar da vasta literatura científica dedicada a este vírus e do seu preponderante papel na evolução da virologia, ainda existem inúmeras incógnitas acerca de sua história natural, tais como sua origem, seus reservatórios no ambiente e sua circulação. O VACV foi reportado como agente causador de infecções naturais no Brasil no final do século XX e, ao longo das últimas duas décadas, têm sido objeto de intensa investigação. Apesar da sua importância histórica, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais este vírus persiste na natureza. Embora o VACV esteja amplamente disseminado em todo o território nacional, é na região Sudeste do Brasil que se identifica como o epicentro principal da circulação deste vírus no país, caracterizando-se pela presença de uma ampla variedade de hospedeiros detectados nesta área geográfica. É na região Sudeste, que são frequentemente documentados surtos de VB, caracterizada como uma zoonose ocupacional assim denominada devido ao seu acometimento ser reportando principalmente em bovinos e ordenhadores. Em virtude da comprovada disseminação silenciosa deste vírus no estado de Minas Gerais, a compreensão da propagação e perpetuação de partículas infecciosas no ambiente natural se configura como um desafio considerável para os pesquisadores, que buscam resolver ou, ao menos, mitigar essa circulação. Além das rotas de infecção já conhecidas, estudos demonstram novas possíveis rotas de transmissão para esse vírus, como é o caso do consumo do queijo/leite. Desta forma, a compreensão acerca do VACV nos produtos lácteos, principalmente QMA se tornam um ponto importante a ser estudado, principalmente após estudos demonstrarem a presença de partículas de VACV em leite e queijo, o que compromete a inocuidade destes produtos. Assim, visando compreender melhor a circulação do VACV, este estudo foi desenvolvido na região do Serro, uma das mais importantes e consagradas regiões produtoras de QMA do estado. Além da sua importância histórica no que tange a produção do QMA, nesta região já foram descritos inúmeros surtos de VB em algumas de suas propriedades, o que demonstra a circulação anterior do vírus na região. A compreensão da dinâmica de circulação do VACV em regiões endêmicas de Minas Gerais é essencial, não apenas para avaliar o risco

de exposição e transmissão do vírus, mas também para desenvolver estratégias eficazes de vigilância epidemiológica e controle da doença. Além da circulação nesta localidade propriamente dita, faz-se necessário compreender a dinâmica de circulação deste vírus para além da região. Por este motivo, além do estudo nas propriedades do município do Serro, este estudo visa compreender o papel da circulação silvestre deste vírus no estado de Minas Gerais. Isso porque o estado de Minas Gerais é um estado reconhecido pela sua vasta biodiversidade, nesse contexto, a investigação da circulação do VACV em animais silvestre, especialmente em primatas não humanos torna-se fundamental para se compreender a dinâmica da transmissão viral entre estes animais e o ambiente silvestre e seu potencial impacto na saúde da população humana e na conservação da vida selvagem. A compreensão dos padrões de circulação do VACV em primatas não humanos também pode fornecer insights valiosos sobre a ecologia do vírus e os fatores que influenciam sua transmissão e persistência no ambiente silvestre e dessa forma contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de vigilância e controle deste patógeno em populações animais e humanas. Assim se torna mais que necessário, compreender sobre a dispersão do VACV nas propriedades da região do Serro-MG e no estado de MG, e implementar iniciativas educativas sobre este agente viral, a doença por ele causada e suas estratégias de controle. Vale ressaltar que estudos sobre medidas educativas no que diz respeito a produção de laticínios de modo geral ainda são muito escassos. Diante deste cenário, este estudo objetiva contribuir para o melhor embasamento na área, garantindo uma melhor inocuidade dos laticínios da região, em especial o QMA e conseqüentemente minimizando o impacto do VACV na economia leiteira da região.

3 CAPÍTULO I – INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DO VACV: CONHECENDO O FLUXO DA PRODUÇÃO DE LATICÍNIOS E A CIRCULAÇÃO DO VÍRUS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS E HUMANOS NA REGIÃO DO SERRO

3.1 Objetivos

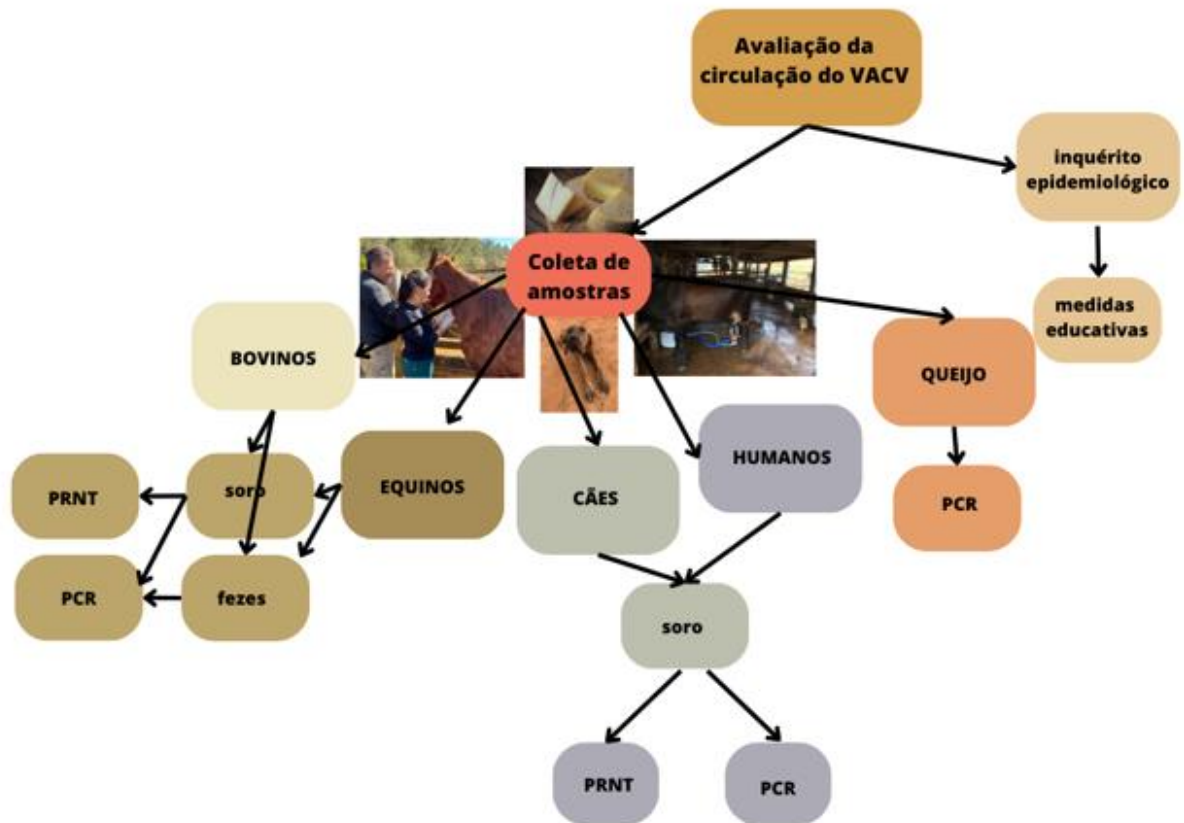
3.1.1 Objetivo geral

Avaliar a circulação do VACV em uma importante bacia leiteira do estado de Minas Gerais e subsidiar as ações dos produtores rurais quanto ao fluxo da produção de laticínios na ausência e presença de surtos.

3.1.2 Objetivos específicos

- Avaliação da circulação do VACV na região rural do Serro, através da detecção de anticorpos neutralizantes em animais domésticos e indivíduos residentes nas propriedades rurais avaliadas;
- Identificação de possíveis rotas de transmissão através da detecção molecular do VACV nas fezes de bovinos das propriedades analisadas buscando compreender o papel das fezes na circulação do VACV;
- Identificação de possíveis rotas de transmissão do VACV através da detecção molecular do VACV em produtos lácteos produzidos nas propriedades investigadas, analisando para isso o leite e o queijo artesanal;
- Identificação da possível relação entre o papel do consumo e manipulação de queijos artesanais e a presença desses anticorpos nos indivíduos residentes das propriedades analisadas;
- Observação de metodologias empregadas no processamento de laticínios, e emprego de medidas educativas quando necessário;
- Capacitação dos produtores rurais em relação às características da infecção bem como os cuidados para preveni-las a partir da distribuição de material na forma de folders e cartilhas sobre o VACV.

3.2 Fluxograma de trabalho



3.3 Materiais e métodos

3.3.1 Delineamento da área e população de estudo

O estudo foi conduzido, por uma equipe multidisciplinar composta por biólogos, médicos veterinários, nutricionista, farmacêutico, na área rural da região do Serro (18°36'17"S 43°22'46"W) município localizado a 329 km da capital Belo Horizonte, em Minas Gerais, que se encontra na região do Vale do Jequitinhonha.

As propriedades foram selecionadas de acordo com a logística de acesso ao local, assim como o aceite prévio por parte dos produtores a receberem nossa equipe, bem como a possibilidade de realização das coletas de amostras clínicas.

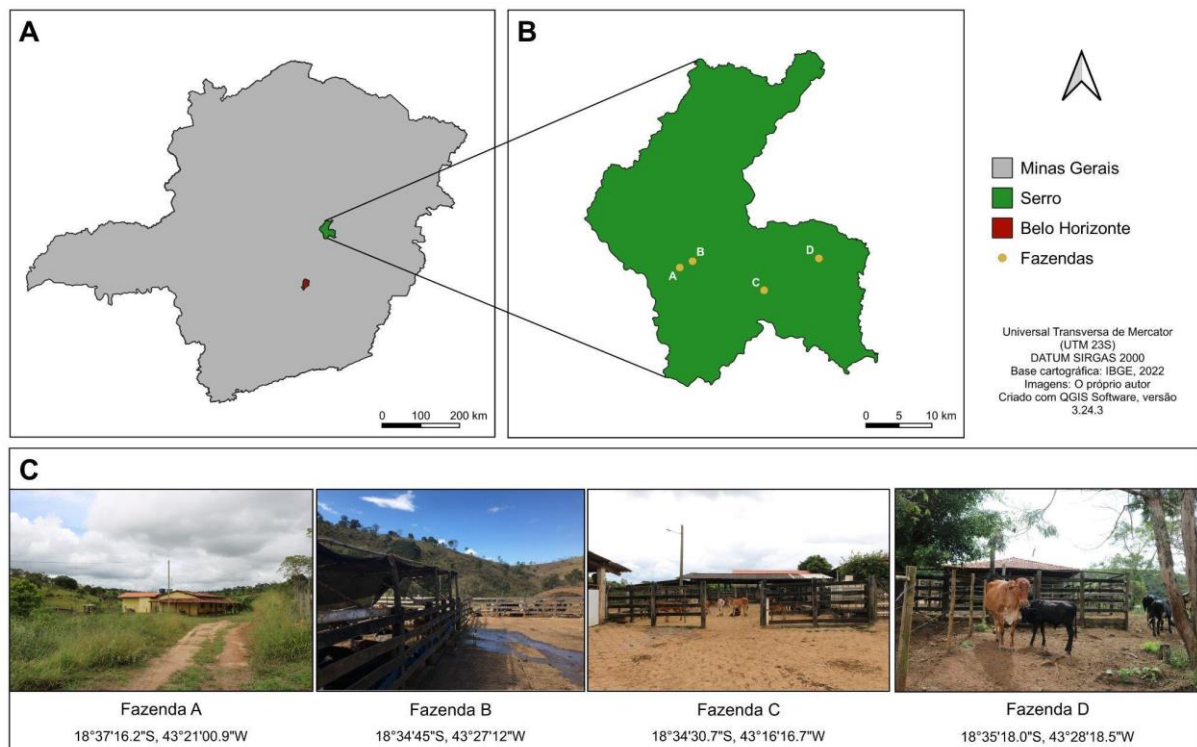
Foi realizada uma avaliação abrangente acerca dos fatores de exposição associados à infecção do VACV, sendo esta assintomática ou a doença clínica, que incluiu a análise do histórico de infecções anteriores, o registro de imunizações passadas (imunização contra a varíola), bem como a consideração dos aspectos comportamentais dos participantes, os quais englobando as práticas relacionadas à manipulação e consumo de leite in natura e/ou queijo artesanal.

Os colaboradores receberam a equipe multidisciplinar da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) que procederam com a aplicação de um questionário semi-estruturado, coleta de espécimes clínicos dos humanos, bovinos, equinos e canídeos, além da coleta de amostras de queijo, leite e fezes dos animais domésticos (bovinos e equinos). As amostras biológicas foram analisadas através de abordagem molecular e sorológica. A abordagem molecular compreendeu a tentativa de detecção do DNA viral nas amostras coletadas através de ensaios de qPCR para e a abordagem sorológica, consistiu em testes de soroneutralização por redução de placa, para avaliação da produção de anticorpos neutralizantes em animais e indivíduos e estimativa da prevalência desses anticorpos nas populações analisadas.

Paralelamente, foi conduzida uma análise detalhada da rotina de produção de laticínios nas propriedades participantes do estudo, abrangendo desde as etapas iniciais do processo, como a ordenha dos bovinos, até o processamento do leite e a subsequente produção dos derivados lácteos, incluindo o queijo. A partir desta análise, foram averiguados os pontos críticos para mitigar a propagação do VACV durante eventuais surtos, e ao término desta supervisão, foram fornecidas aos produtores sugestões metodológicas objetivando aprimorar o processamento desses alimentos, com o intuito de prevenir a exposição ao vírus e a contaminação dos produtos alimentícios.

Posteriormente, as mencionadas medidas metodológicas foram amplamente divulgadas a todos os produtores da região por intermédio da distribuição de material educativo fornecido à cooperativa dos produtores rurais local, material este, elaborado com foco específico para este público-alvo. Além do material impresso, foi elaborado um *pitch* direcionado aos participantes do estudo, além dos produtores rurais da região e os funcionários do IMA, o qual exerce a incumbência de zelar pela defesa animal no âmbito estadual.

Figura 19 – Mapa das áreas de estudo do trabalho



Mapa do estado Minas Gerais. a) localização da cidade do Serro no Estado de Minas Gerais. b) Vista ampliada da zona rural do município de Serro identificando a localização das propriedades amostradas durante esta investigação em amarelo. c) fotos das fazendas amostradas. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.2 Considerações éticas

A participação no estudo foi estritamente voluntária, e a todos os indivíduos abordados foi oferecido um termo de consentimento pós-informado, o qual foi apresentado tanto de forma oral quanto por escrito. Este documento continha informações detalhadas sobre o estudo, seus objetivos, procedimentos e os riscos potenciais associados à participação.

Cada participante do estudo formalizou seu compromisso por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Após as análises das amostras coletadas, foram fornecidos aos participantes os resultados dos testes realizados, juntamente com a interpretação detalhada dos mesmos e seu contexto clínico relevante. Esta proposta foi aprovada pelo Comitê

de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP-4.646.518). Além dos comitês em pesquisa humana, este estudo também foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- 1/2022).

3.3.3 Coleta de amostras

As amostras de soros humanas do estudo foram obtidas através da coleta conduzida por uma farmacêutica designada pela prefeitura do Serro, após a formalização do consentimento livre e esclarecido por parte dos participantes da pesquisa. O processo de coleta foi realizado utilizando tubos estéreis a vácuo, sem ativador de coágulo.

Para a obtenção de soros provenientes de animais domésticos (bovinos, cães e equinos) as coletas foram conduzidas por profissionais veterinários contratados pelo projeto, sendo um deles vinculado à UFMG e outro oriundo do município do Serro, sendo a escolha do profissional a predileção dos proprietários dos animais envolvidos no estudo. Assim como a coleta dos soros humanos, os soros animais foram coletados utilizando-se tubos estéreis a vácuo, isentos de ativador de coágulo.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de fezes de bovinos e equinos, obtidas por meio da extração direta dos animais utilizando-se luvas estéreis, e posteriormente armazenadas em microtubos estéreis. Do mesmo modo, realizou-se a coleta de fezes frescas provenientes das áreas de ordenha e pastagens das propriedades, utilizando-se materiais estéreis para essa finalidade.

Durante o curso do projeto, também foram coletadas amostras de leite e queijo para posterior análise. A obtenção do leite ocorreu concomitantemente ao processo de ordenha, empregando-se tubos Falcon estéreis de 50 ml para a coleta, seguida pelo armazenamento em microtubos os quais foram acondicionados em galão de nitrogênio líquido até a sua armazenagem final. Por sua vez, a aquisição de amostras de queijo foi efetuada diretamente nas propriedades investigadas, seguida pelo porcionamento das peças de queijo para posterior armazenamento em microtubos, a fim de possibilitar análises laboratoriais pertinentes.

Todas as amostras coletadas foram subsequente e cuidadosamente armazenadas em galões de nitrogênio líquido, visando à preservação de sua integridade e estabilidade, antes de serem devidamente transportadas para o laboratório de apoio, Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LADIP), localizado na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri para o seu armazenamento à -80°C até o seu processamento. Posteriormente as amostras foram transportadas ao Laboratório de Vírus da UFMG.

3.3.4 Avaliação clínica

Durante o processo de coleta das amostras humanas, foi realizada uma inspeção visual com o intuito de examinar a mucosa oral dos indivíduos participantes, visando identificar possíveis lesões. Adicionalmente, foi realizada uma inspeção direcionada no braço esquerdo daqueles que poderiam ter sido vacinados contra a varíola, de acordo com sua faixa etária. Tal abordagem se baseia na obrigatoriedade da vacinação contra a varíola no Brasil até o ano de 1978, e na subsequente declaração de erradicação mundial da doença em 1980. A análise da vacinação, ou sua ausência, foi então avaliada considerando as informações fornecidas pelos participantes, assim como suas respostas no questionário aplicado (HOCHMAN *et al.*, 2011).

3.3.5 Padronização das extrações de DNA

Devido à existência de discrepâncias na literatura acerca dos métodos de extração de DNA de amostras provenientes de fezes animais, optamos por realizar a padronização prévia dos procedimentos de extração. Nesse sentido, foi elaborada uma curva de diluição do material fecal, visando estabelecer uma metodologia uniforme e confiável para as extrações subsequentes. O processo de elaboração da presente curva foi iniciado mediante a mensuração precisa de 300 mg de amostra de fezes provenientes de bovino não infectado (oriundo de região não endêmica para VACV), os quais foram devidamente diluídos em 1,5 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) na concentração de 1x. Sequencialmente, ao volume de 483 µl de caldo de fezes diluído, foram adicionados 17 µl da solução de vírus estoque VACV-WR, cuja concentração inicial era 3×10^8 unidades formadoras de placa por mililitro, previamente diluída em PBS. Para a elaboração da curva, a mistura contendo o vírus e as fezes foi homogeneizada utilizando um *vortex* e posteriormente diluída na proporção de 1:10.

Após a construção da curva, procedeu-se à extração das amostras utilizando duas abordagens distintas: o método de extração com o reagente TriZol® e o uso do kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Kit, da fabricante Roche. Esta etapa foi conduzida com o objetivo de realizar uma análise comparativa detalhada, visando determinar a eficácia relativa de cada método na extração do material genético viral a partir das amostras em questão. Este processo foi conduzido com a finalidade de realizar uma avaliação comparativa entre os métodos utilizados e determinar qual deles demonstraria maior eficácia na extração das amostras para as análises subsequentes.

O processo de construção da curva, anteriormente conduzido com amostras de fezes, foi reproduzido utilizando amostras de queijo. Esta etapa teve como objetivo principal a investigação comparativa da eficácia dos métodos empregados na extração do DNA viral, visando identificar qual procedimento seria mais adequado para este propósito no contexto das amostras de queijo.

3.3.6 Processamento das fezes

Antes de proceder à extração, as amostras fecais foram preparadas conforme o protocolo descrito por Dutra e colaboradores (2017), com o intuito de padronizar e seguir um procedimento estabelecido previamente na literatura. Esse processo foi adotado visando garantir a consistência e a fidedignidade dos resultados obtidos durante o processamento destas amostras. Para a preparação foram utilizadas 200 mg das amostras diluídas em 200 µl de PBS. Sequencialmente a diluição anterior foi submetida à maceração utilizando o equipamento em *bead beater* por um período de 30 segundos. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas em baixa rotação (500 rpm por 30') para que o conteúdo orgânico fosse decantado e sequencialmente a fase aquosa foi coletada para posterior extração pelo kit DNA High *Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche de acordo com os dados do fabricante.

Para a padronização foi realizada também a extração com TriZol. Nesta técnica, o primeiro passo é o processo de separação da amostra que consiste na homogeneização da amostra (100µl) em 500µl de Tri reagente, sequencialmente incubar o preparado por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionar 100µl de clorofórmio. Após a adição do clorofórmio, homogeneizar o preparado por 15' em aparelho *vortex* e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Sequencialmente centrifugar o preparado a 12.000g por 15 minutos a uma temperatura de 2 a 8^oC. Após este processamento é possível serem observadas 3 fases: fase orgânica (contendo proteína), interface (contendo DNA) e a fase aquosa (contendo RNA). Para se extrair o DNA é necessário realizar a remoção da fase aquosa e adicionar 150µl de álcool 100%. Em seguida deve-se homogeneizar a solução com auxílio de uma pipeta e incubar por 2 minutos em temperatura ambiente. Sequencialmente centrifugar o preparado a 2.000g por 5 minutos de 2 a 8^oC. Remover o sobrenadante e lavar o pellet de DNA com 50µl de solução de citrato de sódio. Repetir este processo por 2 vezes com um intervalo de 15 minutos entre elas. Sequencialmente, centrifugar o preparado a 2000g por 5 minutos de 2 a 8^oC. Alocar o pellet em 750µl de álcool a 75% e incubar em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, retirar

a fase aquosa para secar o pellet de DNA por 5 minutos. Ressuspender o *pellet* em 50µl de NAOH e centrifugar por 10 minutos a 12000g e transferir para novo tubo.

3.3.7 Processamento do queijo

Para o processamento das amostras de queijo, 100 mg do queijo foi adicionado em 900 µl de PBS 1X. Em seguida, as amostras foram maceradas em aparelho *bead beater* por 30 segundos por 3 vezes seguidas. Do produto da maceração 200 µl foram utilizados para extração pelo kit DNA High *Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche, de acordo com os dados do fabricante.

3.3.8 Vírus

Para os testes de soroneutralização foi utilizado o VACV amostra Western Reserve da coleção de amostras do Laboratório de Vírus da UFMG.

3.3.9 Soros controles

Como controle positivo, foram empregados soros provenientes da coleção do Laboratório de Vírus da UFMG, os quais foram previamente testados por meio de ensaio de soroneutralização. Os soros negativos empregados durante o estudo, foram oriundos de uma região não endêmica para VACV, localizada na região norte do estado de Minas Gerais, mais especificamente no município de Bocaiúva.

3.3.10 Cultivo celular

Nos testes de soroneutralização, foram empregadas células BSC-40, uma linhagem celular contínua de origem epitelial derivada do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiopsis*), obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), Maryland, EUA. As células foram cultivadas em meio de cultura simples (meio mínimo de Eagle – MEM) (Gibco, USA), acrescido soro fetal bovino (SFB) a 5% (Cultilab, Brasil) para o crescimento celular, antimicrobianos gentamicina (140 mg/mL), penicilina (100 U/mL) e anfotericina B (2 ug/mL- para inibir o crescimento de bactérias e fungos) e glutamina (aminoácido essencial), em estufa a 37°C a 5% de CO₂. O cultivo foi realizado em garrafas plásticas variando de 25 CM² a 150 CM² e, posteriormente, as células foram transferidas para placas de 6 poços com fundo chato para a realização do teste de soroneutralização.

3.3.11 Extração do DNA

Todas as amostras foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche, seguindo as orientações do fabricante. Após o processamento (soro, fezes, leite e queijo), 200 µL do material resultante foi ressuscitado em 250 µL de Working Solution, contendo proteinase K, binding buffer e poly(A) (50µL, 200 µL e 0,4 µL respectivamente). A suspensão foi homogeneizada utilizando aparelho vortex e incubada a 72°C por 10 minutos em *termoblock*. Posteriormente, foi adicionado 100 µL de binding buffer a cada amostra e os tubos foram submetidos ao aparelho vortex novamente. O produto foi transferido para colunas com filtro devidamente identificadas e centrifugado por 1 minuto a 8.000g. O líquido filtrado foi descartado e foi adicionado, ao tubo, 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer*, e novamente centrifugado por 1 minuto a 8.000g. Sequencialmente foram adicionados 450 µL de *Wash buffer* em cada coluna, as quais foram submetidas à centrifugação por 1 minuto a 8.000g. Esta etapa de lavagem foi realizada por mais uma vez e os tubos foram submetidos à centrifugação por 1 minuto a 15.000g. As colunas foram acondicionadas em novos microtubos com capacidade 1.5 mL devidamente identificados, e para a etapa de eluição do DNA foram adicionados 50 µL de *elution buffer* em cada tubo. Os tubos foram centrifugados por um período de 1 minuto a 8.000g em seguida. O conteúdo final deste processo, o DNA foi então armazenado em freezer -20°C até a sua utilização.

3.3.12 Diluição das amostras de soro

Além da extração, as amostras de soro também foram submetidas ao PCR em tempo real diluídas na proporção de 1:10. Para esta finalidade, os microtubos foram removidos do freezer a -80°C e descongelados em caixas de isopor contendo gelo. Esse procedimento foi realizado para garantir um descongelamento gradual e controlado das amostras, minimizando possíveis danos aos componentes biológicos e mantendo a integridade das amostras para análises subsequentes. Após o completo descongelamento, os tubos foram agitados utilizando um aparelho *vortex*, a fim de garantir uma homogeneização adequada das amostras. Em seguida, 2 µL de soro foram transferidos para um novo microtubo de 0,6 mL do tipo *Eppendorf*, previamente identificado. Ao resultado da diluição realizada, foram acrescidos 18 µL de PBS nestes novos microtubos e uma nova agitação em aparelho vortex foi realizada. Os soros diluídos foram armazenados em freezer a -20°C até a utilização em teste de PCR em tempo real.

3.3.13 PCR em tempo real

Para a amplificação de diferentes genes virais de OPXV, foram empregados iniciadores

específicos, os quais foram desenhados de forma a reconhecer regiões específicas nos DNAs dos genes alvo, bem como do gene normalizador. Esses iniciadores foram cuidadosamente selecionados para garantir a especificidade e a eficiência da amplificação dos fragmentos desejados durante o processo de PCR em tempo real.

Para a investigação molecular de VACV, as amostras tiveram como alvo os genes C11R, relacionado ao fator de crescimento viral VGF (*viral growth factor*), gene este exclusivo e altamente conservado entre os vírus do gênero OPXV, e devido a isso é frequentemente utilizado em diversos estudos para diagnóstico e caracterização viral de VACV isolados em surtos ocorridos no Brasil. Além do VGF, foi utilizado o alvo HA, proveniente do gene A56R que codifica uma glicoproteína de superfície presente em todos os OPXV, a hemaglutinina viral. Além dos iniciadores específicos anteriormente citados, foi utilizado também um normalizador interno com a finalidade de garantir a padronização das reações (ABRAHÃO et al., 2009; ABRAHÃO et al., 2010; KROON et al., 2016, Trindade et al., 2008).

Assim, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando SYBRGreen® Master Mix Applied Biosystems. O volume da solução de PCR final foi preparado em um microtubo RNase free baseado no número de reações realizadas, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 4 – Quantidade de reagentes utilizados para o PCR em tempo real

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações
Master Mix 2X (<i>Taq</i> DNA polymerase, dNTPs, MgCl ₂ and reaction buffers)	5,0 µl	125,0 µl	250,0 µl
Primer de interesse F+R (10 nmol)	0,2 µl	5,0 µl	10,0 µl
H2O RNase free	3,6 µl	90,0 µl	180,0 µl

Fonte: Elaborado pelo autor.

A reações de amplificação foram realizadas no termociclador StepOne® da Applied Biosystems e os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados pelo software *StepOne*® versão 2.2 da Applied Biosystems.

Tabela 5 – Iniciadores utilizados na reação de qPCR para detecção do gênero OPXV

Iniciadores	Sequências (5'-3')
VGF F	CGCTGCTATGATAATCAGATCATT
VGF R	GATATGGTTGTGCCATAATTTTAT

HA F	CATCATCTGGAATTGTCACTACTAAA
HA R	ACGGCCGACAATATAATTAATGC
β -actina F	AAATCGTGCGTGACATCAAAGA
β -actina R	GCCATCTCCTGCTCGAAGTC

Fonte: Abrahão et al., 2009; Trindade et al., 2008; Laboratório de vírus (não publicado).

Tabela 6 – Condições de tempo e temperatura da reação de qPCR

Pré incubação	Desnaturação	Anelamento	Número de ciclos
95°C 10 min.	95°C 15 seg.	60°C 1 min.	40

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.14 Titulação viral

A titulação viral foi realizada em placas de 6 câmaras, em duplicata, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células BSC40/ câmara cultivadas de 16 a 24 horas, a 37°C em MEM, contendo 5% SFB (Cultilab, Brasil). Em cinco câmaras da placa, o meio foi desprezado e 200 μ L de uma série de diferentes diluições dos vírus, na razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células. Uma câmara não foi infectada, ficando reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1 hora de adsorção a 37°C, 2 ml de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as placas foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas por 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas com solução a 3,7% de formaldeído por 30 minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 μ L, sendo posteriormente convertido para o volume final de 1 mL.

3.3.15 Soroneutralização por redução de placa

As amostras de soros coletadas dos indivíduos e animais da região estudada foram submetidas ao teste de Soroneutralização por redução de placa (PRNT), para pesquisa de anticorpos neutralizantes anti-OPXV. Este ensaio tem como objetivo principal detectar e quantificar o título de anticorpos neutralizantes em amostras de soro para o vírus de interesse. Para a realização desta técnica, o protocolo seguido corresponde ao que foi proposto por Kroon e colaboradores (2016). As amostras de soro foram submetidas a banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação do sistema do complemento. Sequencialmente, as amostras testadas foram diluídas na proporção de 1:20 em meio MEM sem suplementação por soro fetal bovino

(SFB). Sequencialmente, as amostras diluídas foram adicionadas ao mesmo volume de MEM contendo a diluição de VACV-WR previamente titulado para formação de 100 a 150 unidades formadoras de placas (PFU), por poço. Os controles de vírus utilizados na técnica receberam o mesmo tratamento, substituindo a amostra de soro-teste por soro fetal bovino. A mistura foi incubada em estufa de CO² a 5% na temperatura de 37°C por 16 horas. Decorrido este tempo, as amostras foram inoculadas em duplicata em placas de 6 poços contendo células BSC-40 com cerca de 80% de confluência, adsorvidas por 1 hora com intervalos de 15 minutos e, então, os poços receberam a complementação de 2 mL de MEM suplementado a 1% com SFB. As placas foram novamente incubadas em estufa de CO² a 5% e 37°C, mas, desta vez, por 48 horas até que fosse possível a observação do efeito citopático nas células. Após este período, as placas foram fixadas em formaldeído a 3,7% por 30 minutos e coradas com cristal violeta a 1% por 15 minutos. As placas de lise geradas foram contadas manualmente e foram consideradas positivas as amostras que apresentaram redução maior ou igual a 50% do número de placas de lise presentes nos poços de controle de vírus. O título do soro foi calculado pelo inverso da diluição capaz de neutralizar 50% do número de placas que foram detectadas nos controles de vírus. Redução maior ou igual a 50% foram considerados positivos (KROON *et al.*, 2016).

3.4 Resultados e discussão

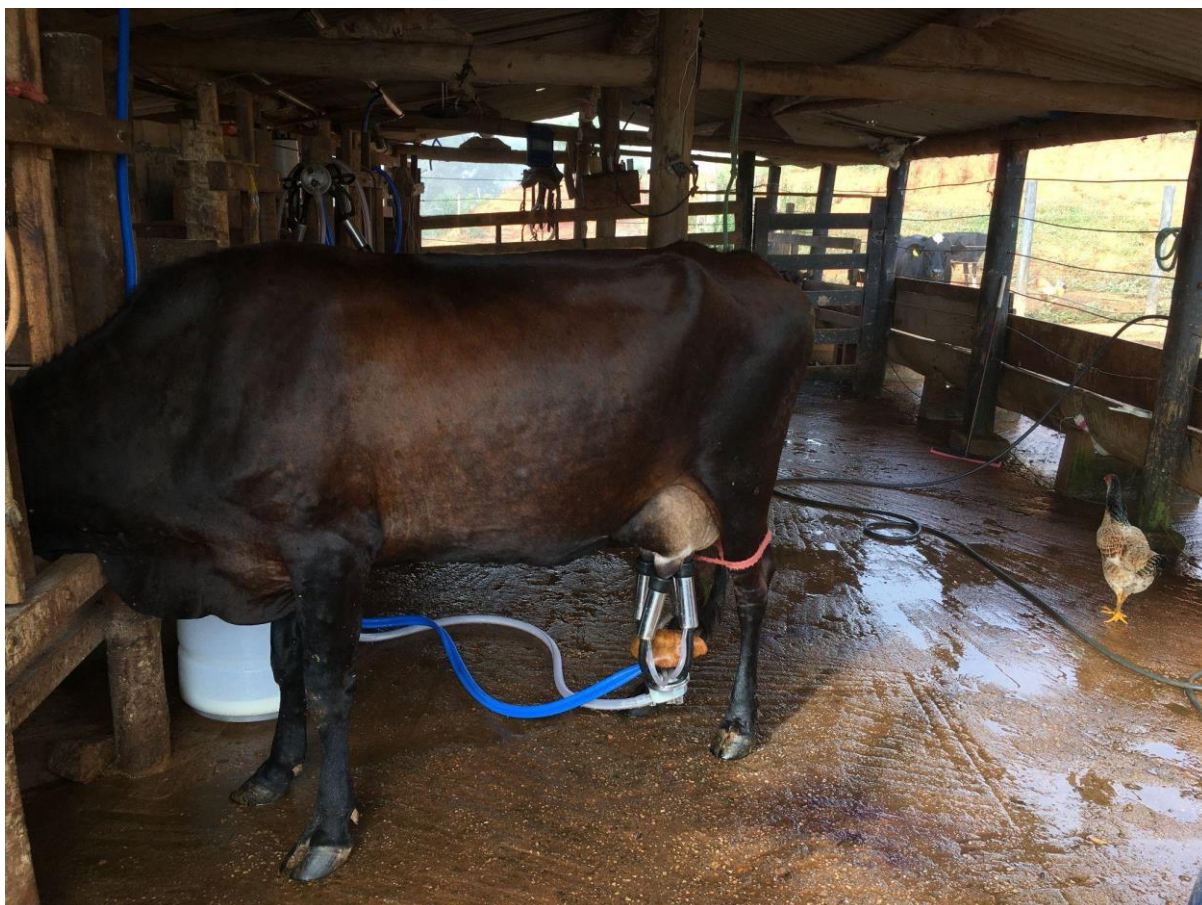
3.4.1 Caracterização das propriedades do estudo e amostras coletadas

No presente estudo foi avaliada a circulação do VACV em propriedades rurais da região do município do Serro, estado de Minas Gerais. Para a realização de tal análise, foram coletadas amostras provenientes de animais domésticos, incluindo bovinos, canídeos e equinos, bem como de indivíduos humanos. Adicionalmente, foram aplicados questionários semiestruturados aos participantes do estudo, os quais previamente assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

As quatro fazendas selecionadas como participantes do estudo estão envolvidas na produção de leite, destacando-se que uma delas efetua a distribuição do referido produto para o laticínio local, enquanto as outras três se dedicam à fabricação do QMA. Em todas as propriedades, o processo de ordenha é realizado de forma automatizada (ordenha mecânica), abrangendo um rebanho que varia de 9 e 150 bovinos.

A primeira propriedade do estudo (A) a Fazenda Maravilha (18°37'16.2"S, 43°21'00.9"W) fica situada a 36 km do município do Serro. A principal atividade da propriedade é a produção de QMA comercializado através da cooperativa do município. Para isso a fazenda conta com um rebanho de 82 animais, com um quantitativo de 27 deles em processo de ordenha. Com o leite produzido diariamente é realizada a fabricação de 4 peças de queijo por dia, totalizando um quantitativo de 120 peças de QMA por mês. A propriedade conta com três colaboradores responsáveis pelo processo de ordenha, assim como a fabricação dos QMA, sendo dois deles colaboradores há aproximadamente 5 anos e moradores da região do estudo e um a cerca de 1 ano e 8 meses na propriedade proveniente do sul do estado. Na figura 20 é possível observar uma imagem do processo de ordenha realizado na propriedade.

Figura 20 – Imagem do processo de ordenha realizado na fazenda Maravilha



Fonte: Arquivo do estudo, 2021.

Segundo dados obtidos através dos questionários aplicados, nenhum dos três colaboradores da propriedade apresentou previamente lesões ou sintomas de VB. Todos eles informaram serem consumidores assíduos de leite e QMA, apresentando inclusive o consumo de leite cru. Devido a questões de disponibilidade dos indivíduos em participar do estudo, não foi possível realizar a coleta de soro dos mesmos.

A propriedade conta com a presença de animais domésticos como cães, gatos e cavalos, possuindo esta proximidade com o ambiente de ordenha e humanos. Em relação a estes animais, os mesmos realizam o consumo de soro de leite, produto residual do processo de fabricação dos QMA. Segundo informações coletadas através do questionário, nenhum animal da fazenda apresentou anteriormente lesões características de infecção pelo VACV.

Durante o processo de coleta de soro destes animais, foi realizada a inspeção clínica dos mesmos pelo veterinário responsável e do mesmo modo não foi observada nenhuma lesão nos seguintes animais, demonstrando que no momento das coletas a propriedade não apresentava nenhuma circulação do vírus naquele momento. Na figura abaixo é possível observar imagens

da fazenda Maravilha participante do estudo.

Figura 21 – Fotografias da fazenda Maravilha



Propriedade, áreas de manejo animal, ordenha e produção dos QMA. Fonte: arquivo do estudo, 2021.

Tabela 7 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Maravilha

Amostras coletadas	Quantitativo
Soro bovino	27
leite	8
fezes	15
soro cães	6
queijo	4

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A segunda propriedade do estudo (B) a Fazenda Amilton (18°34'45"S 43°27'12"W) fica situada a 26 km do município do Serro. A principal atividade da propriedade é a produção de leite, o qual é vendido para um laticínio da região. A propriedade conta com um rebanho de 150 animais, sendo o quantitativo de 55 deles em processo de ordenha, produzindo uma média diária de 600 litros de leite. O processo de ordenha é realizado duas vezes ao dia, e para tal atividade a propriedade conta com um total de 5 colaboradores que trabalham no manejo dos animais e realizam o processo de ordenha.

O processo de ordenha é realizado através de ordenhadeira mecânica sendo a higienização da ordenhadeira realizada com água e os tetos dos animais submetidos a higienização com solução de iodo. A propriedade não utiliza nenhum tipo de hormônio para auxiliar no processo de ejeção do leite pelos animais.

A propriedade conta com uma sede em construção e, portanto, não apresentava nenhum morador no momento do estudo, contudo, ainda sim possuía a presença de 3 cães e 6 gatos, os quais apresentavam proximidade com o rebanho e os humanos ali presentes. Segundo os dados coletados e informados pelo proprietário da fazenda, na propriedade ocorreu o aparecimento de lesões sugestivas de VB na mão de um dos ordenhadores e em alguns animais em ordenha há aproximadamente oito meses antes do início do estudo. Apesar da região do Serro ser uma região endêmica para VACV, não foi realizada a avaliação das lesões assim como exames para confirmação do agente etiológico das mesmas. Portanto, apesar das informações colhidas, não é possível afirmar que as lesões se tratavam efetivamente do VACV.

Durante a condução do estudo na propriedade assim como a coleta do material para análise, os animais foram submetidos a avaliação clínica pelo veterinário responsável, o qual não verificou a presença de lesões nos animais. Deste modo, podemos afirmar que durante a condução do estudo a propriedade em questão não apresentava surto de VACV.

Figura 22 – Coleta de soro realizada durante a condução do estudo na fazenda Amilton



Fonte: Arquivo do estudo, 2021.

A coleta de material do indivíduo que apresentou lesões anteriormente não foi possível, uma vez que este não se encontrava trabalhando na propriedade e não foi possível localizá-lo.

Na figura a seguir é possível observar imagens da propriedade, assim como a área de contenção dos animais antes do processo de ordenha.

Figura 23 – Fotografias da fazenda Amilton



Propriedade, áreas de manejo animal e ordenha. Fonte: Arquivo do estudo, 2021.

Tabela 8 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Amilton

Amostras coletadas	Quantitativo
Soro bovino	39
fezes	11
soro cães	2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A terceira propriedade participante do estudo foi a fazenda Bom Sucesso (18°34'30.7"S, 43°16'16.7"W), localizada a 7 km do município do Serro. Sua principal atividade econômica é a produção de QMA, possuindo medalhas de ouro na categoria de melhor queijo em campeonatos dentro e fora do país como pode ser observado pela figura 24. A propriedade conta com 3 colaboradores responsáveis pelo manejo do rebanho e produção do QMA, sendo dois deles residentes no local.

Figura 24 – Certificado de premiação medalha de ouro QMA Bom Sucesso

Fonte: Acervo particular proprietário da fazenda Adilson de Carvalho, 2021.

Durante a condução do estudo, a propriedade apresentava um rebanho de 90 bovinos, sendo 30 deles em processo de ordenha. A ordenha é realizada de maneira mecânica na qual utiliza-se a aplicação de ocitocina que auxilia na ejeção de leite pelos animais. A aplicação é realizada com o auxílio de uma seringa única a qual é compartilhada entre todos os animais em ordenha. Igualmente a aplicação de ocitocina a desinfecção dos tetos é realizada com solução de iodo, igualmente compartilhada entre todos os animais. Com o montante de leite obtido diariamente a propriedade apresenta uma produção de aproximadamente 25 peças de QMA por dia.

De acordo com os dados obtidos através dos questionários aplicados e entrevista com o

proprietário da fazenda, a propriedade nunca apresentou nenhum surto de VACV, não sendo observadas assim lesões características em animais ou humanos.

A propriedade conta com a presença de animais domésticos sendo eles 20 gatos e 15 cães, possuindo estes contato próximo com os animais em ordenha. Além da proximidade observada entre estes animais e os bovinos, os cães e gatos da propriedade são alimentados com soro residual da produção de QMA.

Figura 25 – Animais se alimentando do soro residual da produção de QMA na fazenda Bom Sucesso



Fonte: Arquivo do estudo 2021.

Tabela 9 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Bom Sucesso

Amostras coletadas	Quantitativo
Soro bovino	24
soro cães	4
fezes	14
queijo	4

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A seguir é possível observar algumas imagens da referida propriedade participante do estudo.

Figura 26 – Imagens da fazenda Bom Sucesso



Fonte: arquivo do estudo, 2021.

A quarta propriedade do estudo a fazenda Ferreira Campos (18°35'18.0"S,

43°28'18.5"W), fica situada a 14 km do município do Serro e possui como principal atividade a fabricação de QMA. A propriedade possui grande tradição no ramo queijeiro, apresentando mais de quatro gerações nesta atividade.

Durante a condução do estudo a propriedade apresentava um rebanho constituído de 12 animais sendo 4 deles em processo de ordenha. A ordenha é realizada de maneira mecânica com a utilização de sanitização realizada com a utilização de solução de iodo e nenhum tipo de hormônio é aplicado nos animais durante este processo. O leite resultante da ordenha é empregado na fabricação do QMA. A propriedade apresenta uma média de produção de 4 peças de QMA diária, totalizando assim um montante de 120 peças mensais.

O processo produtivo fica a cargo do próprio proprietário e seu filho, que juntos são responsáveis pelo manejo do rebanho e fabricação dos produtos. Na propriedade há apenas um residente, o qual não participa do processo de ordenha ou produção dos QMA. A fazenda conta com a presença de 3 cães e 3 gatos, possuindo estes contatos próximo ao rebanho leiteiro.

No que tange a circulação do VACV na fazenda, o proprietário relatou nunca ter ocorrido nenhum indicativo da doença, não sendo observados assim lesões em animais ou humanos que tenha conhecimento.

Tabela 10 – Quantitativo de amostras coletadas na fazenda Ferreira Campos

Amostras coletadas	Quantitativo
soro bovino	6
soro cavalo	5
leite	5
soro cães	3
fezes	12
queijo	4

Fonte: Autor.

Na figura 27 podemos visualizar imagens da propriedade Ferreira Campos, constituída de área de manejo animal, ordenha e armazenamento para maturação do QMA.

Figura 27 – Imagens da fazenda Ferreira Campos



Fonte: Arquivo do estudo, 2021.

De acordo com as informações referentes às propriedades do estudo, três das quatro propriedades participantes não relataram quaisquer ocorrências de surtos de VACV. No entanto, em apenas uma delas (fazenda Amilton), o proprietário relatou a manifestação de lesões no úbere e no focinho de alguns bovinos, bem como nas mãos de um dos ordenhadores, aproximadamente oito meses antes do início do estudo. Contudo, é importante salientar que este evento não foi oficialmente notificado, tampouco foi conduzida uma investigação formal para identificar o agente causador das referidas lesões.

Assim, as quatro propriedades rurais situadas no município em questão foram integradas ao escopo deste estudo. Ao longo do processo de coleta, foram obtidas um total de 199 amostras coletadas. Essas amostras compreenderam não apenas amostras de soro provenientes de animais domésticos e humanos, mas também amostras de fezes dos animais domésticos. Além disso, foram coletadas amostras de leite e queijo, englobando tanto produtos frescos quanto curados. Essa diversidade de amostras coletadas proporcionou uma análise abrangente da presença e distribuição do VACV na região do estudo.

Tabela 11 – Tabela representativa dos testes realizados e do número de amostras utilizadas neste trabalho

Amostras testadas	Nº de amostras (un.)	Técnica PCR Alvos testados	Técnica PRNT
Soros bovinos	95	VGF e HA	Testado
Fezes bovinos/ equinos	52	VGF e HA	Não testado
Soros cavalos	5	VGF e HA	Testado
Soros Cães	15	VGF e HA	Testado
Soros Humanos	7	VGF e HA	Testado
Leite	13	VGF e HA	Não testado
Queijo	12	VGF e HA	Não testado

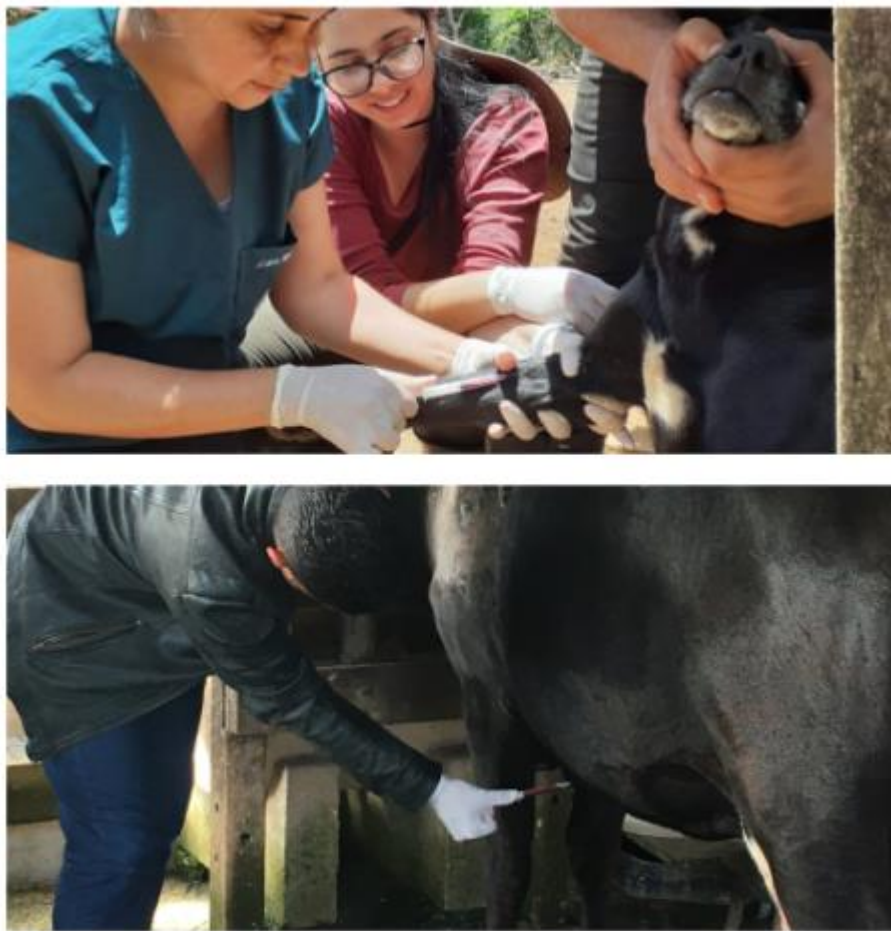
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

3.4.2 Prospecção molecular de OPXV em amostras de soro

Em cada uma das propriedades do estudo, além da presença de seres humanos e bovinos, foram identificados outros animais domésticos, como cães e equinos. Em decorrência deste fato procedeu-se à coleta não apenas de soros de seres humanos e bovinos, mas também de soros desses animais, dada a estreita interação entre todas essas espécies no ambiente em questão. Todos os soros coletados foram analisados molecularmente através da técnica de qPCR.

Assim, procedeu-se à análise molecular de 115 amostras de soro provenientes dos animais das fazendas participantes, sendo 95 amostras de bovinos, 15 de cães e 5 de cavalos. Todos os testes foram conduzidos em duplicata, com repetição em triplicata em caso de resultados inconclusivos. As amostras de soro foram submetidas à extração prévia utilizando um kit comercial específico para esta finalidade e também foram submetidas ao teste a uma diluição na proporção de 1 para 10. Com o resultado dos testes, foi possível observar que não houve detecção do genoma viral em nenhuma das amostras provenientes dos animais testados.

Figura 28 – Coleta de amostras do estudo



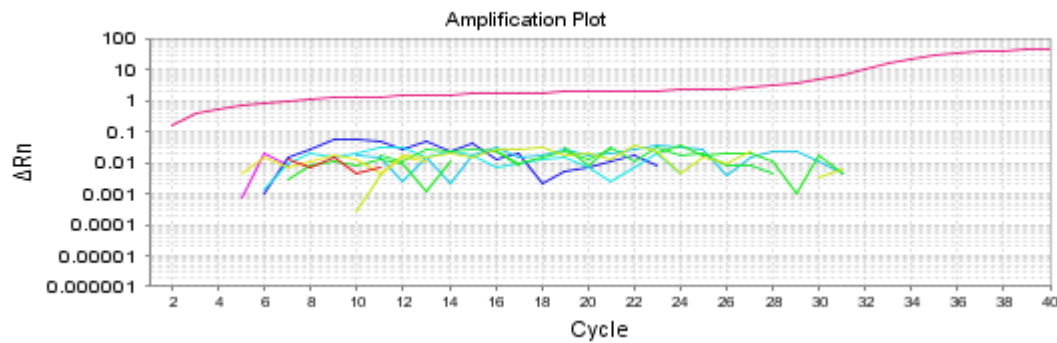
Realização da coleta de soro de cão, bovino. Fonte: Acervo do estudo, 2021.

Da mesma forma que as amostras animais, as amostras humanas (um total de 7) foram submetidas ao método qPCR, e todos os resultados foram negativos para os genes VGF e HA. Esses resultados evidenciam a ausência de surtos durante o período de coleta, que ocorreu entre fevereiro a outubro de 2021, bem como em períodos imediatamente anteriores ao início do estudo. Isso se deve ao fato de que a detecção do VACV em soros humanos, por meio do qPCR, é viável dentro de uma janela de até dois meses após a infecção. Em outras palavras, é possível

detectar a presença do DNA viral no soro humano por meio desta técnica durante esse intervalo de tempo após a infecção pelo VACV.

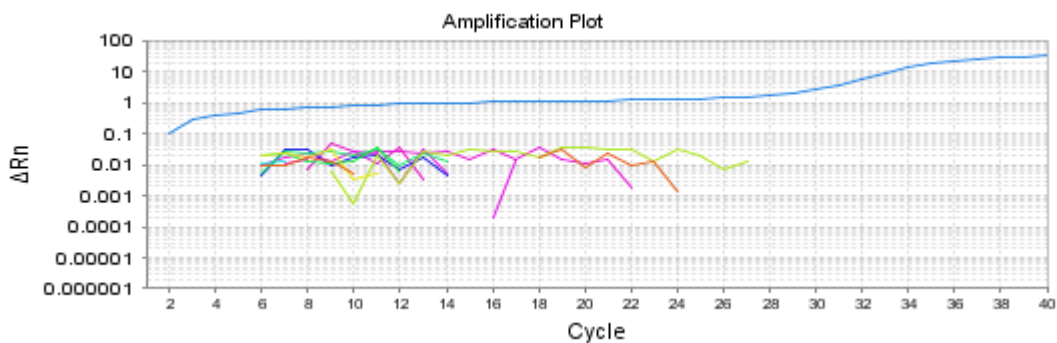
Nas figuras a seguir (29 e 30) é possível observarmos os resultados negativos dos testes realizados para os dois alvos VGF e HA, os quais foram extraídos com kit comercial específico para extração de DNA viral e de forma diluída como encontramos na literatura. Nas imagens é possível observar a amplificação apenas do controle positivo do teste.

Figura 29 – Teste de qPCR para os alvos VGF e HA utilizando DNA extraído



Fonte: Elaborador pelo autor, 2021.

Figura 30 – Teste de qPCR para os alvos VGF em amostras de soros diluídos dez vezes



Fonte: Elaborador pelo autor, 2021.

3.4.3 Prospecção do VACV em fezes dos bovinos

Para a realização da prospecção de VACV em fezes bovinas, foram coletadas amostras das 4 fazendas participantes do estudo. As fezes foram coletadas diretamente dos animais como pode ser observado na figura 31, assim como da área de ordenha e manejo animal.

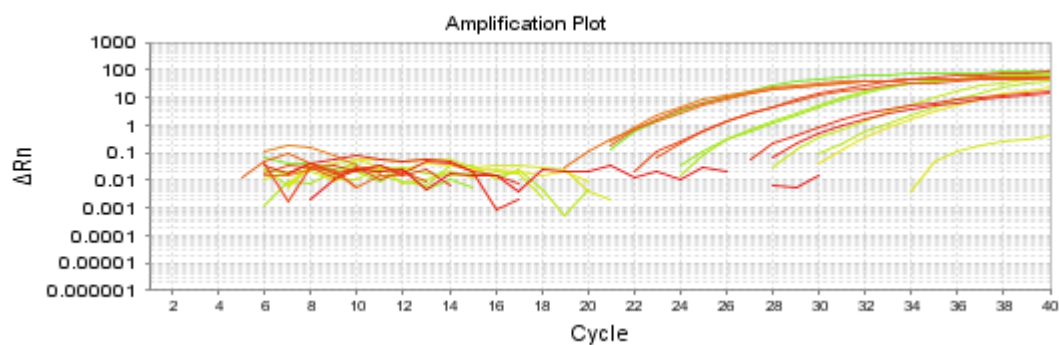
Figura 31 – Coleta de amostras do estudo



Realização da coleta de fezes bovinas. Fonte: Acervo do estudo, 2021.

Devido à falta de consenso nas referências no que tange a extração de fezes para posterior análise por qPCR para VACV, foi realizado previamente a padronização para se obter a melhor maneira de se realizar tal procedimento. Para isso foram testadas extrações utilizando a técnica de extração de DNA com TriZol[®] e utilizando o kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche. Primeiramente, amostras de fezes de bovinos de área sem relatos de surtos de VACV (norte de Minas) foram utilizadas a fim de garantir a inclusão de amostras negativas para VACV. Estas amostras foram contaminadas com o vírus VACV-WR proveniente do Laboratório de Vírus da UFMG e sequencialmente foram submetidas ao processo de extração pelos dois métodos previamente descritos. Os resultados podem ser observados na figura a seguir.

Figura 32 – Padronização da extração de fezes por dois métodos distintos



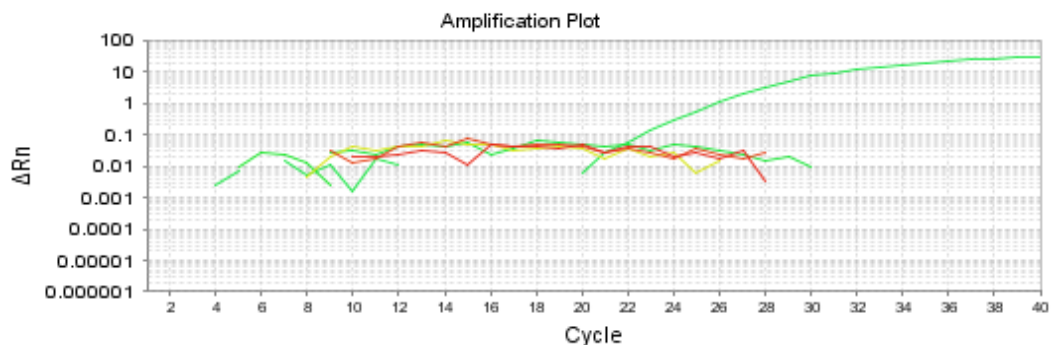
Extração com TriZol[®] (em verde) e kit comercial (em vermelho). Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

No gráfico é possível observar a melhor performance do kit comercial Roche quando comparado a utilização do método de extração via TriZol®. Isso porque, como pode ser observado a curva em vermelho que representa a extração pelo kit comercial Roche, apresentou amplificação precoce em relação a curva verde que representa a extração pela técnica de extração utilizando o TriZol®. Diante deste resultado, as extrações das fezes deste estudo foram realizadas com a utilização do kit comercial *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche.

Assim, as amostras de fezes dos animais domésticos provenientes das quatro fazendas, das quais as amostras foram coletadas, foram submetidas ao protocolo de extração utilizando o kit comercial mencionado.

Como podemos observar na figura 24, todas as amostras com exceção do controle positivo foram negativas para o alvo VGF através da técnica de qPCR. Além do gene VGF, as análises foram realizadas para o alvo HA e do mesmo modo apresentaram resultados negativos, demonstrando assim, que no período de amostragem os animais testados não se encontravam excretando o VACV pelas fezes.

Figura 33 – Amplificação do gene VGF em amostras de fezes bovinas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

3.4.4 Prospecção molecular de OPXV em amostras de leite e queijo

Igualmente as amostras de soro e fezes, as amostras de leite e queijo passaram por processo de padronização da extração do DNA e sequencialmente foram analisadas pela técnica molecular de qPCR. As amostras de 12 amostras de queijo e 13 amostras de leite apresentaram apenas resultados negativos, demonstrando, que no momento das coletas os animais não apresentavam infecção ativa, não sendo possível detectar o VACV nestes produtos.

A análise mencionada assume uma importância crucial, especialmente à luz de estudos como o conduzido por Abrahão e colaboradores em 2009, que sustentam a hipótese de que o leite é uma fonte potencial de exposição e transmissão do VACV. E uma vez contaminado

mesmo submetido a tratamentos térmicos, partículas viáveis do VACV podem ser detectadas, como foi demonstrado por De Oliveira e colaboradores, 2010.

Nesse contexto, o VACV emerge como uma fonte significativa de preocupação, principalmente devido ao fato de que o QMA, não passa por nenhum tratamento térmico durante o seu processo de produção, o que poderia inativar potenciais agentes infecciosos. Isso sugere que, em propriedades onde surtos do VACV estejam ocorrendo, o QMA pode representar um veículo de transmissão do vírus aos consumidores. Esse cenário ressalta a necessidade de implementação de medidas preventivas rigorosas durante todas as etapas da produção e manipulação do QMA para garantir a segurança alimentar e a proteção da saúde pública.

Como evidenciado por Rehfeld e colaboradores em 2017, os queijos produzidos a partir de vacas experimentalmente infectadas pelo VACV apresentaram a persistência de partículas infecciosas do vírus, mesmo após o processo de maturação por 60 dias. Essa constatação revela a presença de um risco significativo à saúde pública, tornando esses produtos inadequados para consumo devido à presença de um vírus viável.

3.4.5 Soropositividade para OPXV nas propriedades estudadas

Nos últimos vinte anos, podemos observar um crescente no que tange a investigação sobre a circulação e a manutenção do VACV em ambientes rurais, silvestres e urbanos no Brasil. No entanto, apesar dos esforços, ainda há muitas lacunas a serem elucidadas sobre o ciclo de transmissão deste vírus. Especificamente, pouco se sabe sobre o papel das espécies de animais domésticos e/ou silvestres nesse processo, o que destaca a necessidade contínua de pesquisas adicionais para elucidar completamente essa complexa dinâmica de transmissão (TRINDADE *et al.*, 2007, OLIVEIRA *et al.*, 2017, COSTA *et al.*, 2015).

Neste trabalho foram analisadas 7 amostras de soros humanos e 115 amostras de soros de animais domésticos oriundos das propriedades rurais onde o estudo foi conduzido. Na tabela abaixo podem ser observados o quantitativo de cada grupo assim como os resultados encontrados nos testes de soroneutralização por redução de placa, que demonstra a soropositividade para OPXV das referidas amostras.

Tabela 12 – Grupos analisados por PRNT para o gênero OPXV

Grupo	PRNT Positivo (un.)	PRNT Negativo (un.)	Total Animais (un.)	Positivo (%)	Negativo (%)
Bovinos	93	2	95	97,89	2,11
Equídeos	5	0	5	100,00	0,00

Canídeos	12	3	15	80,00	20,00
Humanos	5	2	7	71,42	28,58

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A investigação sorológica das amostras coletadas na região revelou um cenário de circulação silenciosa do VACV entre os animais domésticos presentes, abrangendo tanto bovinos quanto equinos e cães. Esses resultados refletem uma dinâmica epidemiológica complexa e preocupante, evidenciando a possível presença e disseminação do vírus em diversas espécies animais de interesse econômico e sanitário. Estes achados demonstraram uma soropositividade para OPXV maior que 70% nas amostras analisadas, indicando uma alta taxa de exposição ao vírus entre os animais da região. Especificamente, os equídeos apresentaram uma soropositividade de 100%, sugerindo uma prevalência significativamente alta do VACV nessa população.

Esses achados são de extrema relevância epidemiológica, uma vez que destacam a importância de uma vigilância ativa e contínua para monitorar e controlar a propagação do VACV em áreas rurais. Além disso, ressaltam a necessidade de implementação de medidas preventivas e estratégias de manejo adequadas para reduzir o risco de transmissão do vírus entre os animais e, potencialmente, para humanos.

Os resultados do nosso estudo demonstram de fato a circulação silenciosa do VACV na região estudada, uma vez que das quatro propriedades avaliadas, apenas uma relatou anteriormente a ocorrência de lesões sugestivas de VACV em bovinos e humanos. Esse achado indica que, embora a manifestação clínica da doença possa ser esporádica ou subclínica, a presença do VACV nas propriedades rurais pode ser mais disseminada do que indicam os registros de casos clínicos. Isso ressalta a importância da vigilância epidemiológica ativa para detectar e monitorar a circulação do vírus mesmo em áreas onde a ocorrência de casos sintomáticos seja baixa.

A circulação silenciosa do VACV nesta região suscita preocupações significativas, especialmente devido ao fato de o município do Serro ser um grande polo produtor de leite e uma das principais regiões queijeiras do estado. Sua importância na produção de laticínios é destacada pelo fato de ter sido a primeira região a ser reconhecida como patrimônio imaterial e posteriormente ser reconhecida pela Convenção da UNESCO (NETTO, 2011). Diante desse cenário, a presença do VACV na região pode representar um risco significativo para a indústria láctea local, bem como para a saúde pública, destacando a necessidade de medidas preventivas e de controle para mitigar os potenciais impactos negativos dessa circulação viral. Dessa forma, a circulação do VACV pode ocasionar surtos e estes estão diretamente relacionados à

diminuição da produção de leite, a morbidade dos trabalhadores que lidam diretamente com o rebanho assim como a falta de inocuidade dos produtos produzidos a partir da matéria prima contaminada (BORGES *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O estreito contato entre os animais domésticos e os bovinos, conhecidos como hospedeiros do VACV, pode oferecer uma explicação plausível para a alta soropositividade observada em todos os grupos analisados. Apesar da falta de dados consolidados sobre a transmissão específica entre os diferentes animais domésticos presentes nas fazendas, estudos indicam que o compartilhamento de espaço, bem como de comedouros e bebedouros, pode desempenhar um papel significativo na disseminação do vírus entre esses animais. Borges e colaboradores em 2018 demonstraram que quando os equídeos e bovinos são mantidos juntos na propriedade, e devido à natureza do trabalho exigido, o contato dos equídeos com os bovinos é consideravelmente intenso. Por esse motivo é comum que os equídeos tenham acesso livre aos currais, compartilhem pastagens, água e dispositivos de alimentação com os bovinos; portanto, equídeos alojados em pequenas propriedades com gado leiteiro podem de fato estar mais expostos a qualquer patógeno circulante entre o gado leiteiro. Do mesmo modo, podemos inferir que o contato dos cães com os bovinos, podem favorecer o processo de disseminação de patógenos que afetam os bovinos como o VACV nestes outros grupos de animais. Essa interação próxima e a potencial exposição a agentes infecciosos entre os diferentes grupos animais podem contribuir para a ampla prevalência do VACV observada na região estudada (PERES *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2018).

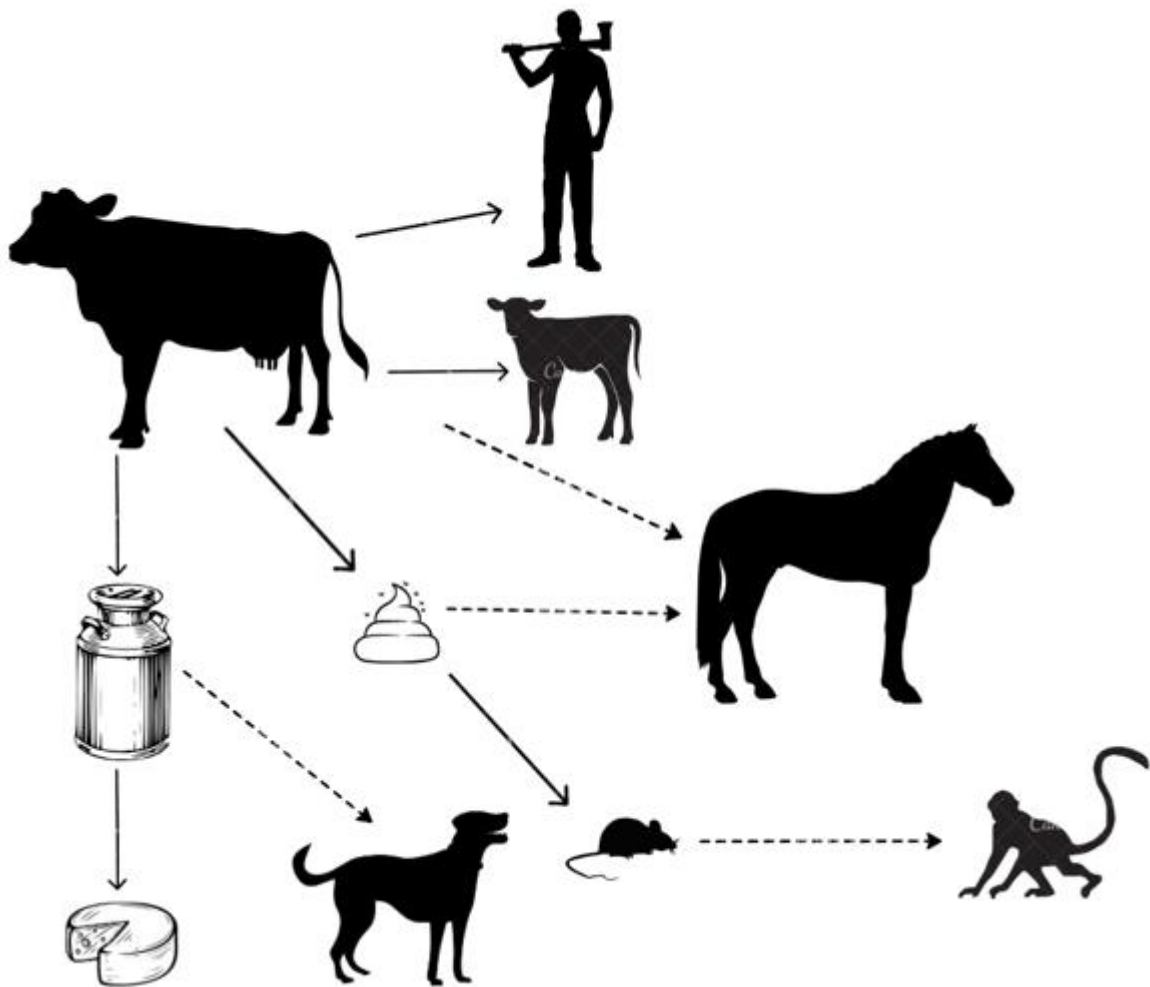
Outro fator crucial na disseminação e perpetuação da circulação do vírus nas propriedades são as fezes dos animais infectados. Estudos demonstraram que vacas experimentalmente infectadas têm a capacidade de eliminar o vírus através das fezes. Essa via de excreção do vírus pode contribuir significativamente para a disseminação do VACV no ambiente, especialmente em áreas onde há contato próximo entre animais e onde práticas sanitárias podem ser sub ótimas. Portanto, a contaminação ambiental por meio das fezes representa uma importante rota de transmissão e deve ser considerada na implementação de medidas de controle e prevenção da doença nas propriedades rurais (REHFELD, 2016). D'anunção e colaboradores em 2012, demonstraram em seus estudos que camundongos BALB/c expostos a fezes de vacas experimentalmente infectadas adquiriram a infecção e eliminaram o vírus em suas fezes, sugerindo que as fezes de bovinos infectados poderiam representar uma fonte constante de contaminação ambiental do VACV. Rehfeld e colaboradores (2016) por sua vez, demonstraram em seus estudos que vacas infectadas experimentalmente por VACV eliminam o DNA viral em suas fezes mesmo após a resolução das lesões em seus úberes.

Dessa forma, esses estudos mencionados também sugerem que as fezes de vacas infectadas podem representar uma fonte crítica de transmissão do VACV, desempenhando um papel significativo na disseminação do vírus dentro da propriedade e potencialmente entre fazendas vizinhas. Essa constatação destaca a importância de medidas eficazes de controle e prevenção para limitar a propagação do vírus, incluindo práticas sanitárias adequadas, manejo cuidadoso dos dejetos animais e vigilância epidemiológica ativa para identificar e responder rapidamente a surtos de doenças.

Essa hipótese não foi corroborada pelo presente estudo, pois nos testes moleculares conduzidos utilizando a técnica de qPCR, não foi detectado DNA viral do VACV nas amostras coletadas. Assim como com os resultados moleculares das amostras de queijo e leite, os quais indicaram a ausência de surtos recentes nas propriedades avaliadas. Essa falta de detecção do DNA viral sugere que, embora o VACV possa estar circulando de forma silenciosa na região, não houve evidências de uma atividade recente ou surtos agudos da doença durante o período de estudo.

A figura 25 a seguir, representa as possíveis vias de infecção ou exposição demonstradas no trabalho, sendo elas vias já estabelecidas na literatura e vias hipotéticas de infecção.

Figura 34 – Possíveis rotas de infecção/exposição pelo VACV



As setas contínuas indicam as vias de transmissão já consolidadas na literatura e as setas tracejadas possíveis rotas de infecção. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Outro fator importante no que tange a circulação do vírus entre os bovinos analisados pode se dar devido ao uso de sanitizantes pré ou pós ordenha. Nas propriedades analisadas constatamos que todas elas faziam uso de sanitizante por pelo menos uma vez durante o processo de ordenha (antes ou depois). Apesar do uso de sanitizante nos tetos das vacas, remeterem a um manejo mais cuidadoso, o uso do mesmo copo de sanitizante sem a troca do seu conteúdo em todos os animais pode representar uma fonte de contaminação e disseminação do vírus. Estudos realizados Borges e colaboradores (2017) demonstram que o uso da substância inadequada ou da substância certa em diluições inadequadas devido ao excesso de diluição pode tornar o sanitizante incapaz de inativar o vírus ou de modo contrário em altas concentrações como no uso de iodo por exemplo, pode ressecar o teto e gerar lesões, ocasionando assim, pequenas soluções de continuidade que facilitam o processo de exposição

ao vírus ou de infecção. Ou seja, deste modo, caso um animal esteja infectado, esta técnica de sanitização de maneira inadequada, pode acarretar na disseminação do vírus através dos tetos destes animais. É importante salientar que a exposição das mucosas do teto às partículas virais inativadas também pode gerar imunidade anti-OPXV.

3.4.6 Soropositividade anti-OPXV em humanos

No que diz respeito à detecção da presença de anticorpos OPXV nos soros humanos, é importante salientar que trabalhamos com um número amostral reduzido, devido ao número reduzido de indivíduos residentes nas propriedades estudadas. Isso se deve ao fato em parte devido à sua proximidade com o perímetro urbano, assim, alguns membros das famílias participantes do estudo residiam na cidade mais próxima, que é o município do Serro. Esse contexto de baixa densidade populacional nas fazendas impactou no tamanho do número amostral disponível para análise, limitando assim a generalização dos resultados obtidos. Deste modo, das quatro propriedades do estudo, foi possível realizar a obtenção de sete amostras de soro humano.

Tabela 13 – Faixa etária dos indivíduos participantes do estudo levando em consideração a vacinação contra a varíola até o ano de 1978.

	Número de indivíduos (un.)	Positivo n^o (%)	Negativo n^o (%)
Faixa etária			
≤44 anos	3	1 (33,3)	2 (66,6)
>44 anos	4	4 (100)	0 (0)
Consome leite			
Sim	7		
Não	0		
Pratica ordenha			
sim	3		
não	7		
Consome queijo			
sim	7		
não	0		

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Neste estudo, analisamos amostras de 7 indivíduos, com idade variando de 20 a 63 anos.

Dentre os indivíduos amostrados, 5 apresentaram anticorpos anti-OPXV, correspondendo a um resultado de 71,42% de soropositividade dentro o grupo amostrado. Estes dados são superiores aos encontrados por Costa e colaboradores em 2016, os quais, mediante um estudo transversal realizado na região rural do município do Serro entre os anos de 2012 e 2013, contando com a colaboração de 240 voluntários, demonstraram uma soroprevalência de 30.8% para os OPXV. No entanto, é plausível que nossos resultados sejam atribuídos à limitação do tamanho amostral utilizado na pesquisa, bem como à presença significativa de indivíduos com idade superior a 44 anos. A possibilidade de imunização prévia contra a varíola em alguns desses indivíduos deve ser considerada, o que poderia influenciar os resultados, contudo 2 indivíduos com idade superior a 44 anos, informaram não ter sido vacinados e não possuíam marca vacinal. Estudos prévios evidenciam a eficácia duradoura da imunidade conferida pela vacina contra a varíola, o que sugere que a presença dessa imunidade pode ter impacto nos resultados observados. Isso porque, indivíduos vacinados podem apresentar a presença de anticorpos por longos períodos pós vacinação visto que anticorpos específicos anti-OPXV atingem o pico um mês após a vacinação, diminuindo durante o primeiro ano e, em seguida, se mantêm constantes durante vários anos. Hammarlund e colaboradores em 2003 demonstraram que mais de 90% dos voluntários vacinados dos seus estudos mantiveram resposta imune humoral e/ou celular detectável pelo período de 25-75 anos após a vacinação (KENNEDY *et al.*, 2009; MOSS, 2013; HAMMARLUND, *et al.*, 2003).

Estudos conduzidos por Mota e colaboradores (2010) na região rural amazônica revelaram uma soroprevalência significativamente menor, estimada em 27,9% entre os indivíduos analisados. Esta disparidade em relação aos resultados da nossa pesquisa pode ser explicada por diversas razões. Primeiramente, é importante considerar a diferença nas áreas geográficas estudadas, visto que características ambientais e epidemiológicas variam entre regiões. Além disso, a composição da população investigada por Mota e colaboradores (2010) pode diferir daquela do nosso estudo, com variações em termos de ocupação e exposição a determinados agentes infecciosos, neste caso ao VACV. Nosso estudo se concentra em trabalhadores rurais envolvidos na criação de bovinos, cuja exposição ao VACV pode ser mais intensa em comparação com outras populações rurais. Essa diferenciação na exposição ocupacional pode influenciar diretamente os níveis de soroprevalência observados entre os grupos de estudo.

Tabela 14 – Dados sobre consumo e manipulação de queijo

Indivíduo	1	2	3	4	5	6	7
Idade	20	22	25	46	55	60	63

Consome leite	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Leite cru ou fervido	fervido	ambos	fervido	fervido	ambos	fervido	fervido
Frequência consumo de leite	mensal	semanal	semanal	semanal	semanal	semanal	semanal
Manipula leite cru/ fabrica QMA	não	sim	não	sim	sim	não	sim
Realiza ordenha	não	sim	não	não	sim	não	sim
Ordenha mecânica ou manual	-	mecânica	-	-	mecânica	-	mecânica
Consome queijo	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Frequência do consumo QMA	diário	diário	diário	diário	diário	semanal	diário

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

No entanto, um achado importante do nosso estudo foi a detecção de anticorpos anti-OPXV em indivíduos que, sabidamente não foram vacinados contra a varíola, uma vez que nasceram posteriormente ao ano de 1978. Este dado nos dá indícios de uma exposição a OPXV, neste caso, potencialmente ao VACV, que é o OPXV que circula endemicamente na região (TRINDADE *et al.*, 2009, TRINDADE *et al.*, 2016, ASSIS *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que dentre os indivíduos amostrados, aqueles com faixa etária menor que 44 anos foram os que apresentaram menor soropositividade para OPXV. Deve-se levar em consideração que um dos indivíduos reside há pouco tempo na região, sendo proveniente do ambiente urbano e os outros 2 indivíduos residem na área urbana da cidade do Serro, sendo que um deles não possui contato assíduo com o ambiente rural, fatores estes que podem justificar a menor incidência de soropositividade neste grupo.

Tabela 15 – Dados demográficos dos indivíduos participantes do estudo com menos de 44 anos de idade

Demografia	Número	PRNT positivo	PRNT negativo
Gênero			
Masculino	2	1	1
Feminino	1	0	1
Faixa etária (anos)			
20 ≤ 44	3	1	2
Cor da pele autorreferida			
Pardo	1	0	1
Preto	1	0	1
Branco	1	1	0
Nível educacional			
Ensino fundamental ou menos	0	0	0
Ensino médio ou mais	3	1	2

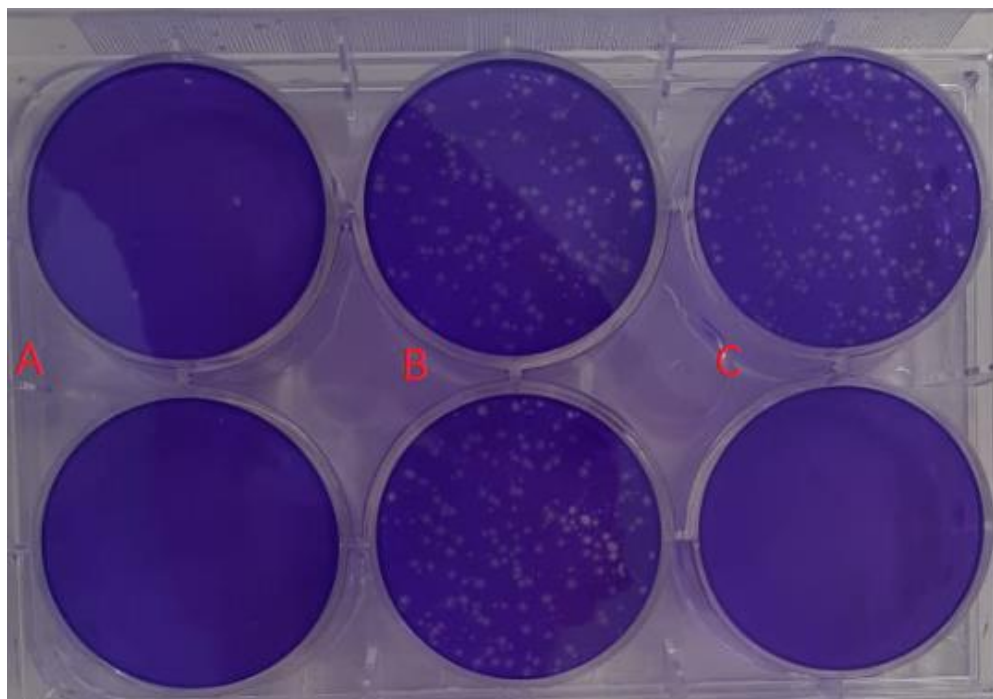
Nunca foi à escola	0	0	0
Área de residência			
Rural	1	0	1
Urbano	2	1	1
Ocupação			
Trabalhadores rurais	1	1	0
Donas de casa	1	0	1
Outros	1	0	1

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Outro fator relevante que pode explicar a maior incidência de anticorpos neutralizantes observada em indivíduos com idade superior a 44 anos está relacionado à prática regular da ordenha e manipulação de leite cru durante a produção de queijo, além da possibilidade de terem sido vacinados. Isso se deve ao fato de que, dentro do grupo de indivíduos mais jovens, com idade até 44 anos, apenas um deles estava envolvido no processo de ordenha e produção de queijo a partir do leite cru, resultando em um menor tempo de exposição a esse produto e, conseqüentemente, em uma menor probabilidade de contato com o vírus. É importante destacar que este mesmo indivíduo foi o único deste grupo a apresentar soropositividade para anticorpos anti-OPXV, reforçando a hipótese de que a exposição ao processo de ordenha e ao leite cru pode ser um fator determinante na exposição ao vírus. Esse achado sugere que a manipulação direta do leite cru durante a produção de queijo pode representar uma importante via de exposição ao VACV, especialmente em comunidades onde essa prática é comum, como na região em estudo.

Abaixo podemos observar uma placa de PRNT realizada durante o estudo, demonstrando um indivíduo com mais de 98% de anticorpos neutralizantes capazes de neutralizar o VACV-WR.

Figura 35 – Soropositividade para OPXV por PRNT



A) amostra humana com mais de 98% de soroneutralização. B) Amostra negativa. C) Controle da placa (poço superior controle de vírus e poço inferior controle de células. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

3.4.7 Conhecimento dos ordenhadores/ produtores sobre a doença

Durante a aplicação do questionário e ao fornecer informações sobre o VACV e a doença por ele causada, foi observado que 42% dos participantes do estudo afirmaram possuir algum nível de conhecimento sobre a referida doença. Estes indivíduos relataram ter adquirido essas informações por meio da TV, interações com outros proprietários de fazendas ou veterinários, que transmitiram conhecimento sobre este tema ao longo do tempo. No entanto, apesar do reconhecimento prévio da existência da doença, constatou-se que a profundidade do conhecimento sobre a VB era limitada entre os participantes. Eles demonstraram não estar familiarizados com detalhes cruciais, como as formas de transmissão da doença, sua disseminação entre propriedades, métodos para identificar a origem da infecção, estratégias de controle ou mesmo o quadro clínico associado à doença. Essa lacuna de conhecimento sugere uma necessidade de educação e conscientização mais abrangente sobre a VB, visando melhorar a capacidade dos produtores e criadores de gado de detectar, prevenir e responder eficazmente a casos da doença em suas propriedades.

Tabela 16 – Dados do inquérito epidemiológico aplicado no estudo

Indivíduo	1	2	3	4	5	6	7
Idade	20	22	25	46	55	60	63

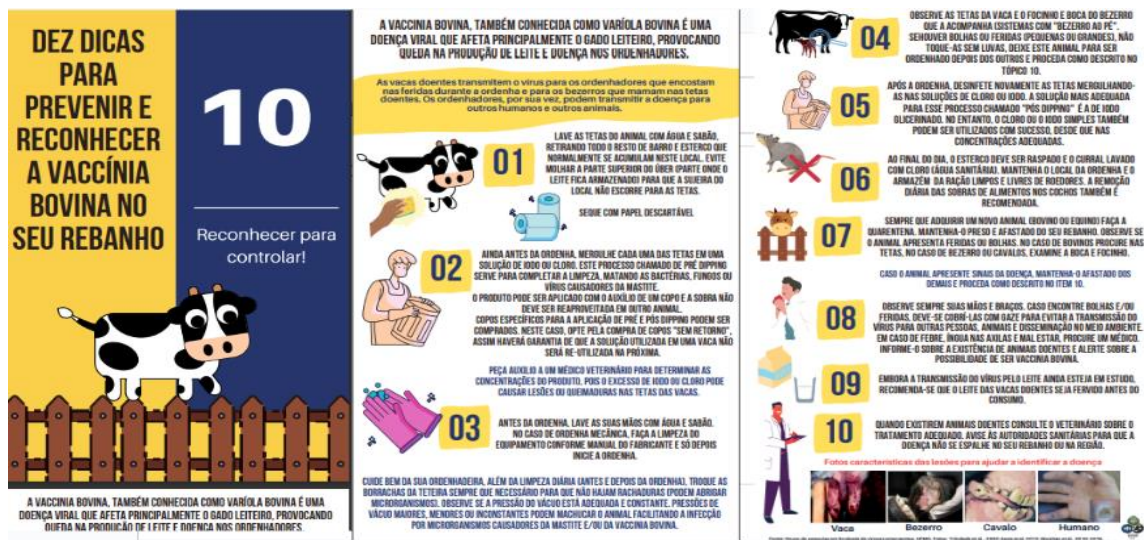
Contato c/ animais domésticos	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim
Manejo e ordenha	não	sim	não	não	sim	não	sim
Contato animais silvestres	não	não	não	não	não	não	não
Já ouviu falar sobre VB	sim	sim	não	não	sim	não	não
Como conheceu a VB	TV	ocorrência em outra propriedade	-	-	veterinário	-	-
Já teve VB	não	não	não	não	não	não	não
Foi vacinado contra Varíola	não	não	não	não	sim	sim	não

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2021.

Dessa forma, é possível inferir que, embora os participantes relataram ter conhecimento da existência da doença, esse conhecimento tende a ser superficial e não oferece uma base sólida para medidas de controle efetivas por parte dos produtores. Destacando a necessidade urgente de educação continuada e apoio técnico para fortalecer a capacidade dos produtores de gado em lidar com questões de saúde animal.

Por esse motivo, decidimos implementar uma estratégia de intervenção educacional, consistindo na distribuição de materiais informativos aos participantes do estudo. Esses materiais educativos incluem folders elaborados pelo grupo de estudos Ecovir, abordando informações detalhadas sobre o VACV, a doença por ele causada, além de orientações sobre formas de transmissão e medidas de controle da doença. A entrega desses materiais teve como objetivo principal fornecer aos produtores de gado conhecimento substancial e prático sobre a VB, capacitando-os a adotar medidas preventivas e de controle mais eficazes em suas propriedades. Essa iniciativa busca preencher a lacuna de informação identificada durante a pesquisa e contribuir para uma melhor gestão da saúde animal na região estudada.

Figura 36 – Cartilha educativa sobre conhecimento e prevenção da VB no rebanho



Fonte: Grupo Ecovir, 2019.

Figura 37 – Cartilha educativa sobre a VB



Fonte: BARBOSA, et al., 2021.

3.4.8 Consumo de leite e queijo

Neste estudo, uma das questões investigadas refere-se ao papel do consumo de leite e seus derivados, especialmente se contaminados, e sua possível contribuição para a exposição ao VACV. Considerando que o VACV pode ser transmitido através do contato com secreções e excreções de animais infectados, como o leite cru pode ser uma fonte potencial de contaminação. Portanto, examinamos a hipótese de que o consumo de leite e seus derivados não pasteurizados, obtidos de animais infectados ou de ambientes onde o VACV está presente, pode representar uma via de exposição ao vírus para os seres humanos. Essa análise visa avaliar o potencial risco de transmissão do VACV por meio do consumo desses alimentos e destacar a importância de práticas adequadas de higiene e controle de qualidade na produção e comercialização de produtos lácteos, visando mitigar os riscos à saúde pública relacionados à VB.

Os resultados obtidos em nosso grupo amostral revelaram que uma parcela significativa dos participantes, correspondendo a 85%, apresentavam o hábito de consumir leite e queijo provenientes de suas próprias propriedades pelo menos três vezes por semana. Entre esses

indivíduos, uma proporção considerável, representando 42,8%, relatou fazer o consumo de leite cru pelo menos uma vez por semana, diretamente no curral da propriedade durante o processo de ordenha. Esses achados assumem relevância considerável, especialmente à luz de um estudo conduzido por Rehfeld e colaboradores em 2015, que demonstrou a detecção molecular do VACV em amostras de swab oral, quando avaliaram a infecção experimental em um modelo murino através da ingestão de leite contaminado. Além de Rehfeld, Oliveira, 2021 realizou um estudo com 372 indivíduos provenientes da população urbana da região do Serro e demonstrou a detecção molecular do gene C11R em 21 (5.6%) amostras, o número foi ainda maior utilizando como alvo o gene A56R, sendo possível observar um quantitativo de 33 (8.8%) amostras positivas. Os resultados foram confirmados através de sequenciamento, demonstrando se tratar do vírus VACV. Essas descobertas destacam a importância de considerar o consumo de leite cru e seus derivados como uma possível via de exposição ao VACV, o que sugere a necessidade de medidas preventivas e de segurança na produção e consumo desses produtos lácteos, visando proteger a saúde pública contra os riscos associados à VB.

Nos estudos conduzidos, foram empregadas técnicas de detecção molecular para acompanhar a presença do VACV e avaliar a soroconversão nos animais infectados, mesmo na ausência de sinais clínicos associados à doença. É importante ressaltar que o VACV pode ser eliminado no leite de vacas infectadas, mesmo em casos de infecção subclínica, ou seja, em que não há manifestação de sintomas evidentes da doença. Essa característica representa um desafio significativo para o monitoramento da segurança desses alimentos, uma vez que a presença do vírus pode não ser detectada visualmente e mesmo animais que não demonstram sinais de doença podem ser portadores e transmitir o vírus através do leite. Assim, a capacidade do VACV de ser eliminado no leite, mesmo em casos assintomáticos, ressalta a importância de medidas rigorosas de controle e monitoramento para garantir a segurança dos produtos lácteos, com ênfase na adoção de práticas de higiene adequadas e métodos de pasteurização para inativar o vírus e reduzir os riscos para a saúde pública (ABRAHÃO *et al.*, 2009C; REHFELD *et al.*, 2017; 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2017; MATOS *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, Oliveira e colaboradores, 2017 avaliaram a detecção dos genes C11R e A56R em queijos comercializados em um grande centro urbano do estado de Minas Gerais, o município de Belo Horizonte. Em seus achados, os pesquisadores observaram uma detecção de 28% destes genes das amostras analisadas. Sendo deste modo possível inferir que o consumo de leite de derivados contaminados com VACV pode ser uma via de infecção.

Outro achado importante é a manutenção da viabilidade do VACV em diferentes intervalos de maturação dos queijos artesanais. Conforme demonstrado por Rehfeld e

colaboradores em 2017, o vírus foi detectado em queijos submetidos a processos de maturação por até 45 e 60 dias a uma temperatura de 25°C. Essa persistência prolongada do VACV em queijos durante um período substancial de tempo aumenta significativamente a possibilidade de exposição dos consumidores ao vírus. Dessa forma, o papel do leite e seus derivados torna-se crucial no que se refere a potenciais fontes de exposição ao VACV. Esses achados reforçam a importância de implementar medidas rigorosas de controle e segurança ao longo de toda a cadeia produtiva de laticínios, desde a produção até o consumo final, com o intuito de mitigar os riscos relacionados à transmissão do VACV por meio desses alimentos e garantir a proteção da saúde pública.

3.5 Conclusão

A circulação ampla do VACV no estado de Minas Gerais é uma realidade constatada, sendo observada sua presença na região do Serro desde o ano de 2005. A evidência dessa circulação não se restringe apenas aos animais bovinos, mas também inclui equinos, canídeos e seres humanos. As análises sorológicas realizadas em todos esses grupos revelaram consistentemente a presença de anticorpos anti-OPXV, confirmando a ocorrência da circulação silenciosa do vírus na região. Esse cenário reforça a importância de uma vigilância epidemiológica contínua e abrangente para monitorar a disseminação do VACV e implementar medidas preventivas e de controle adequadas. Além disso, destaca a necessidade de conscientização e educação da população local sobre os riscos associados à exposição ao vírus, visando proteger a saúde pública e prevenir a ocorrência de surtos da doença. Apesar das diferentes frequências, todos os grupos analisados são hospedeiros do VACV, confirmando o amplo espectro já proposto para o patógeno. Isso porque a soropositividade entre os grupos foi de no mínimo 71,42% (humanos) chegando a 100% no caso dos equídeos analisados. Muito embora este trabalho não seja suficiente para a determinação dos papéis precisos de cada animal na circulação do VACV ou na ocorrência da VB, a alta taxa de soropositividade observada em todos os grupos demonstra a necessidade de maior atenção sobre a circulação do VACV. A soropositividade observada em humanos pode estar intimamente relacionada não apenas ao contato direto com os bovinos, mas também ao consumo de leite cru e seus derivados, como o queijo produzido a partir dele. Além disso, o contato direto com os bovinos representa outra possível via de exposição ao VACV. A constatação da circulação silenciosa do VACV entre os grupos analisados destaca a necessidade urgente de implementar medidas de controle para a VB que envolvam o manejo adequado desses animais. Essas medidas tornam-se ainda mais imprescindíveis diante da constatação de que, apesar dos participantes relatarem possuir conhecimento sobre a doença, esse conhecimento se mostra superficial e insuficiente para o controle efetivo da circulação do vírus. Ademais, a recente emergência de infecções clínicas pelo VACV requer monitoramento constante. A ausência de casos clínicos humanos associados à VB pode ser uma questão meramente temporal. Portanto, é essencial manter a vigilância epidemiológica ativa e estar preparado para responder rapidamente a qualquer aumento na incidência de infecções clínicas relacionadas ao VACV. A adoção de medidas preventivas e de controle robustas, aliada à educação e conscientização da população, é fundamental para mitigar os riscos à saúde pública e prevenir potenciais surtos da doença.

4 CAPÍTULO II – INVESTIGAÇÃO DO TEMPO E TEMPERATURA NECESSÁRIOS PARA INATIVAR O VACV EM LEITE EXPERIMENTALMENTE INFECTADO

4.1 Objetivos

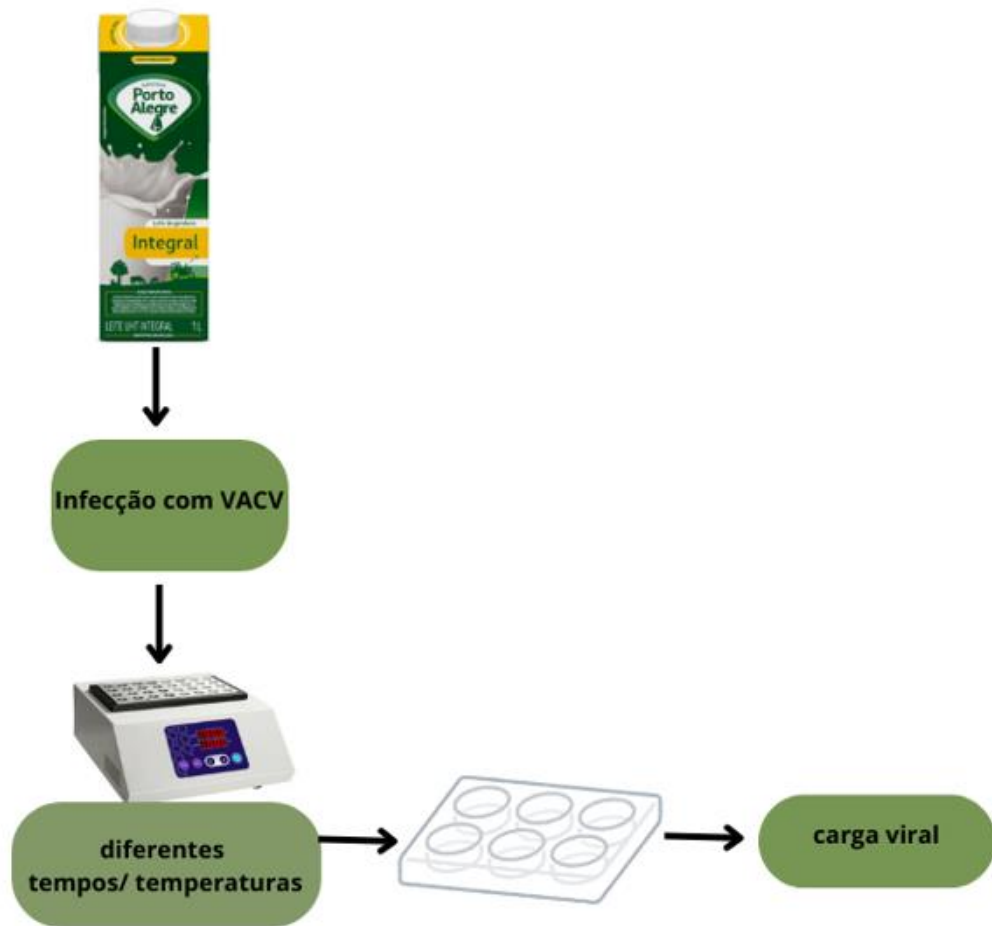
4.1.2 Objetivo geral

Investigar os parâmetros de tempo e temperatura necessários para a inativação do VACV presente no leite UHT experimentalmente infectado, visando obter uma compreensão dos intervalos de tempo e temperatura necessários para a inativação eficaz deste vírus em ambientes de produção durante períodos de surtos de VACV.

4.1.3 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo e temperatura empregados capazes de inativar o VACV em leite experimentalmente infectado;
- Avaliar a importância da carga viral do VACV presente no leite infectado frente diferentes tempos e temperaturas;
- Avaliar o papel do armazenamento do leite infectado sob refrigeração e sua importância no que tange a manutenção da carga viral de VACV presente no leite infectado.

4.2 Fluxograma de trabalho



4.3 Materiais e métodos

4.3.1 Cultivo celular para titulação viral

O cultivo celular foi realizado conforme o item 5.10 apresentado anteriormente no capítulo I do presente estudo.

4.3.2 Vírus

O vírus utilizado no presente estudo encontra-se descrito no item 5.8 do capítulo I.

4.3.3 Titulação Viral

A titulação viral foi realizada conforme descrito no item 5.14 do capítulo I deste estudo.

4.3.4 Infecção experimental do leite UHT Leite infectado

Em nosso estudo, utilizamos em nossos experimentos o leite UHT integral comercial da marca Itambé. Este leite foi então infectado com a cepa amostra VACV Western Reserve cedida pelo Laboratório de Vírus da UFMG. Dessa forma, o vírus que se encontrava armazenado a uma temperatura de -80°C , passou pelo processo de descongelado em uma caixa com gelo para que não sofresse um descongelamento abrupto. Sequencialmente, o vírus foi alocado em um sonicador ultrassônico a fim de que os vírus presentes na solução se dissipassem no meio. Este processo foi realizado por 3 vezes em um intervalo de tempo de 30 segundos, seguidos de 30 segundos alocados em uma caixa de gelo com a finalidade de buscar a preservação do título viral. Posteriormente este vírus VACV foi diluído em $1.800\mu\text{l}$ de leite UHT para obter a concentração de 10^4 vírus/ml. Em seguida, o leite infectado foi armazenado em *ependorfs* estéreis e alocados em banhos secos no tempo e temperatura de interesse. O tempo e temperatura de interesse foram: $4^{\circ}\text{C}/96$ horas; $22^{\circ}\text{C}/1$ hora, $40^{\circ}\text{C}/5$ minutos/ 10 minutos/ 30 minutos/ 45 minutos/ 60 minutos; $50^{\circ}\text{C}/5$ minutos/ 10 minutos/ 30 minutos/ 45 minutos/ 60 minutos; $60^{\circ}\text{C}/30$ minutos/ 45 minutos/ 60 minutos; $90^{\circ}\text{C}/30$ minutos/ 45 minutos/ 60 minutos. Após o processamento térmico, $50\mu\text{l}$ de leite infectado foi diluído em $450\mu\text{l}$ MEM 0%, resultando assim em um título de 10^3 vírus/ml.

4.3.5 Avaliação da inativação de partículas virais

Para avaliação da inativação viral, $50\mu\text{l}$ de leite infectado foram diluídos em $450\mu\text{l}$ MEM 0%. Em seguida, $450\mu\text{l}$ de leite infectado diluído foi alocado em placas de cultura contendo células BSC40 com monocamada apresentando 80% de confluência. As placas foram

então submetidas ao processo de adsorção que consiste na agitação das mesmas em um intervalo de tempo de 10 em 10 minutos durante o período de 1 hora. Sequencialmente foi adicionado em cada poço 1,6 ml de MEM suplementado a 2% de FBS. Essas placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 48 horas. Após este período, as placas foram fixadas com formaldeído a 3,7% por 30 minutos e coradas com cristal violeta 2% por 15 minutos. Finalizado este processo, as placas de lise foram contabilizadas para constatar a inativação ou não do vírus pelo tempo e temperatura de interesse.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 A influência da temperatura na inativação do VACV

Para verificarmos a influência da temperatura na inativação do VACV, um dos pontos de preocupação durante a condução do nosso estudo, foi a manutenção estável das temperaturas durante os testes. Devido a esta preocupação, os testes conduzidos em temperatura ambiente, foram realizados em sala fechada com ar condicionado para nos proporcionar o maior controle possível da temperatura. Desse modo, a temperatura ambiente, uma das nossas temperaturas de interesse permaneceu estável durante todo o processo, sendo a temperatura ambiente mantendo-se a 22°C. No que diz respeito a condição para o teste de em baixa temperatura, esta permaneceu estável a 4°C. As demais temperaturas interessantes de interesse foram 40, 50, 62, 70 e 90 °C controladas por aquecedor digital de banho seco/bloco, por períodos que variaram de 5 minutos a 1 hora. Em todas as condições do estudo, além da manutenção da temperatura pelos equipamentos anteriormente citados, termômetros de mercúrio foram utilizados, a fim de se obter aferir com maior precisão o mais fidedigno possível as temperaturas de interesse.

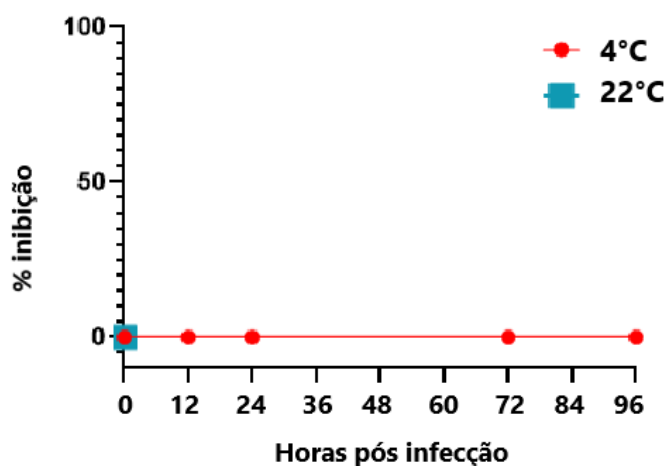
Mimetizados e considerados todos os pontos de interesse, o primeiro teste consistiu em observar se a temperatura da geladeira (4°C) seria capaz de diminuir ou afetar a carga viral. Os resultados obtidos nesta fase inicial de investigação demonstraram que a carga viral permaneceu inalterada por um período de até 96 horas quando mantida sob condições de temperatura de refrigeração. Este teste representa um dos aspectos fundamentais da nossa pesquisa, especialmente ao considerar regiões endêmicas do VACV, como o Brasil. Isso porque em muitas regiões e propriedades, é comum que o leite ordenhado seja armazenado em geladeiras até o momento do consumo. Com base nas observações realizadas durante nosso estudo de campo, constatamos que, em muitos casos, este leite armazenado em geladeira é consumido diretamente, sem que seja submetido a qualquer processamento térmico prévio, o que ressalta a importância de investigar a estabilidade do VACV nessas condições específicas de armazenamento e consumo de leite.

Este aspecto assume uma importância crucial, pois o leite infectado e armazenado sob refrigeração em geladeira sem ser submetido a qualquer tratamento térmico pode representar uma fonte significativa de contaminação para os consumidores desse produto nessas condições, especialmente em áreas endêmicas. Esta prática pode, assim, servir como uma potencial via de infecção para o VACV, destacando a necessidade iminente de conscientização sobre os riscos associados ao consumo de leite não tratado termicamente em regiões onde o VACV é endêmico. Além disso, ressalta a importância de implementar medidas de segurança alimentar adequadas para mitigar o potencial de transmissão do VACV por meio desta forma de consumo.

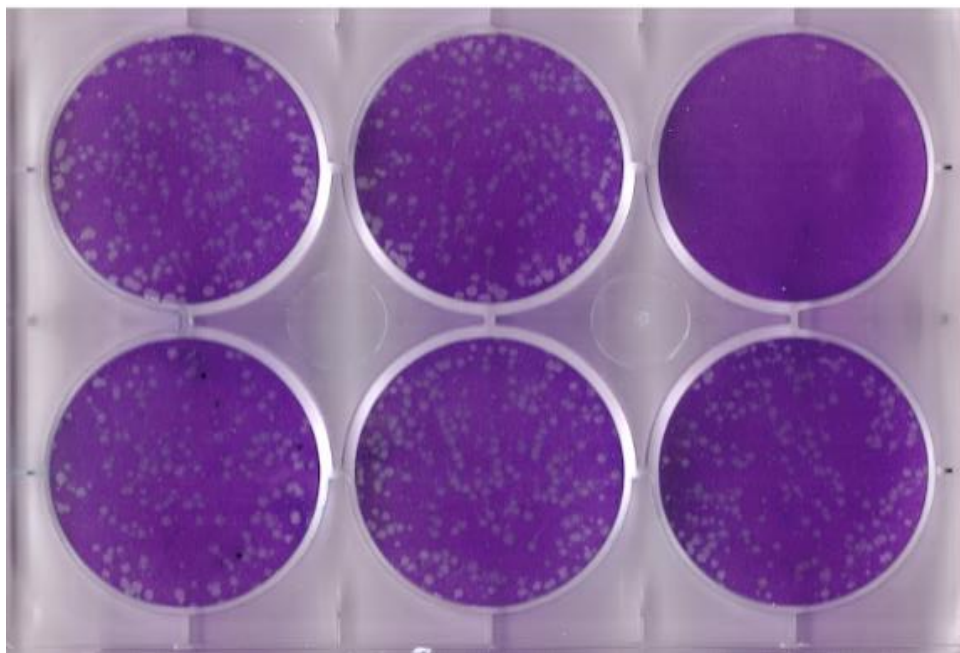
De acordo com os estudos conduzidos por De Oliveira e colaboradores em 2010, foi observado que o VACV manteve sua viabilidade no leite após 48 horas de armazenamento em câmara fria e freezer. Os resultados obtidos em nosso estudo corroboram com essas descobertas, demonstrando uma concordância com os achados prévios mencionados.

Adicionalmente, os estudos realizados por Costa e colaboradores em 2015, os quais investigaram uma população rural em uma área endêmica de VB na região da bacia leiteira do Serro, não identificaram correlação entre a detecção de anticorpos neutralizantes anti-OPXV e o contato direto com rebanhos ou ambientes silvestres. Esses achados sugerem a possibilidade de que o leite infectado possa representar uma via potencial de infecção para os seres humanos, especialmente considerando a estabilidade prolongada do VACV em diferentes condições de armazenamento. Essa hipótese enfatiza a importância de se compreender e abordar os riscos associados ao consumo de leite contaminado, bem como a necessidade de implementar medidas adequadas para mitigar a transmissão do VACV por essa via (DE OLIVEIRA 2010; COSTA *et al.*, 2015).

Figura 38 – VACV à temperatura de refrigeração (4°C)



Leite infectado com VACV após 96 horas incubado em geladeira. Os círculos vermelhos representam o tempo em que o leite infectado foi testado durante 96 horas. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

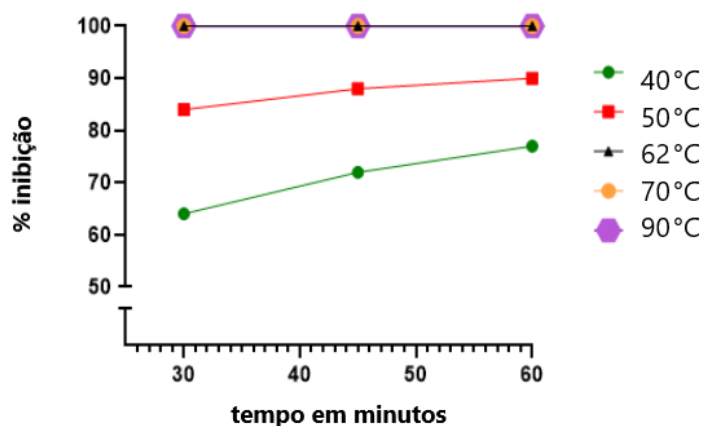
Figura 39 – Titulação do leite infectado

Titulação do leite infectado após 96 horas a 4°C. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Como pode ser observado na figura 38 o leite UHT, portanto um produto sem nenhum tipo de contaminação foi infectado com uma carga viral de 10^3 de VACV e verificamos o título viral ali presente nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 e 96 horas pós infecção, submetido a uma temperatura de 4°C. Como pode ser observado, mesmo após 96 horas, a titulação do vírus permaneceu estável, não apresentando qualquer diminuição ao longo do experimento sob esta temperatura. Este resultado é preocupante, especialmente em regiões endêmicas para o VACV, pois indica que o vírus pode manter sua viabilidade por um período prolongado de tempo mesmo em condições de refrigeração, o que aumenta o potencial de transmissão e a importância de medidas preventivas rigorosas nessas áreas.

Embora tenha sido observado durante nosso estudo que muitos indivíduos consomem leite sem qualquer processamento térmico, é importante destacar que alguns deles optam por submeter o leite a um processo de fervura, conhecido como tratamento térmico doméstico. Diante dessa variação de práticas de consumo, realizamos a submissão do leite experimentalmente infectado pelo VACV a diferentes tempos e temperaturas de tratamento térmico. O objetivo desse procedimento foi investigar como esse binômio de tempo e temperatura é capaz de reduzir a carga viral do VACV no leite. Essa abordagem experimental nos permitirá compreender melhor a eficácia do tratamento térmico na inativação do VACV e, por conseguinte, avaliar sua relevância na segurança alimentar em contextos onde o consumo de leite é frequente.

Figura 40 – Inativação térmica do VACV em diferentes tempos e temperaturas



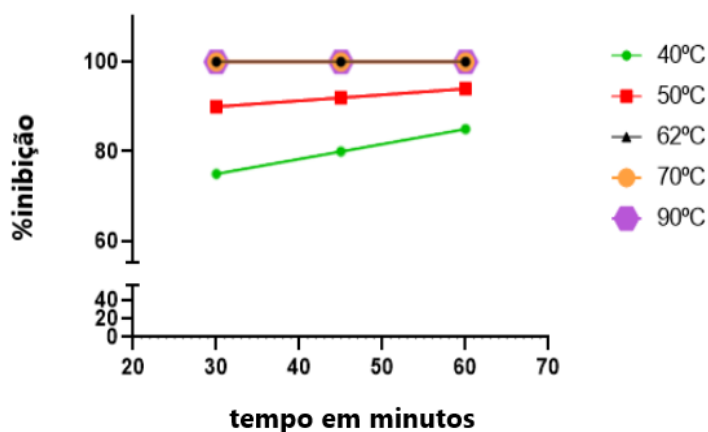
Resultados da inativação do VACV após diferentes tempos e temperaturas com leite experimentalmente infectado (103 PFU/ml). A cor verde representa 40°C, vermelha 50°C, preta 62°C, laranja 70°C e roxa 90°C. É possível observar que temperaturas acima de 62°C são capazes de inativar completamente o vírus a carga viral inicial. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Durante os experimentos, foi possível realizar uma análise abrangente do comportamento do VACV em resposta a uma variedade de tempos e temperaturas. Essa análise permitiu uma compreensão mais detalhada da sensibilidade do VACV às condições térmicas variáveis, contribuindo assim para a avaliação da eficácia de diferentes protocolos de tratamento térmico na inativação do vírus.

Como pode ser observado no gráfico 33 em temperaturas de 40°C e 50°C, o vírus apresenta uma diminuição expressiva da carga viral entre 30 e 60 minutos. Em contrapartida, é possível constatar que as temperaturas de 62°C, 70°C e 90°C foram capazes de inativar totalmente a carga viral do leite presente no leite. Estes resultados corroboram com estudos conduzidos por Kampf que demonstram a eficácia do calor contra o VACV (Kampf, 2022).

Diante dessas descobertas, buscamos investigar o impacto da carga viral nos resultados obtidos. Para tanto, replicamos os mesmos experimentos sob as mesmas condições, tempos e temperaturas de interesse, porém utilizando uma carga viral mais elevada (10⁶ PFU/ml). Essa abordagem nos permitiu avaliar como a variação na carga viral pode influenciar a resposta do VACV aos diferentes tratamentos térmicos, proporcionando uma compreensão mais abrangente dos fatores que afetam a eficácia desses protocolos na inativação do vírus. Os resultados podem ser observados a seguir.

Figura 41 – Inativação térmica do VACV em diferentes temperaturas



Resultados da inativação do VACV após diferentes tempos e temperaturas com leite experimentalmente infectado (106 PFU/ml). A cor verde representa 40°C, vermelha 50°C, preta 62°C, laranja 70°C e roxa 90°C. É possível observar que temperaturas acima de 62°C são capazes de inativar completamente o vírus. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Conforme evidenciado na figura 34, observamos que a carga viral não teve impacto significativo na inativação do vírus. Os experimentos conduzidos com uma carga viral mais elevada não apresentaram resultados substancialmente diferentes daqueles realizados com uma carga viral de 10^3 PFU/ml. Essa constatação sugere que, dentro do intervalo de cargas virais testadas, a eficácia dos tratamentos térmicos na inativação do VACV não foi sensivelmente afetada pela variação da carga viral. Esses resultados são relevantes para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção da transmissão do VACV por meio de produtos lácteos, indicando que os protocolos de tratamento térmico podem ser igualmente eficazes independentemente da carga viral inicial.

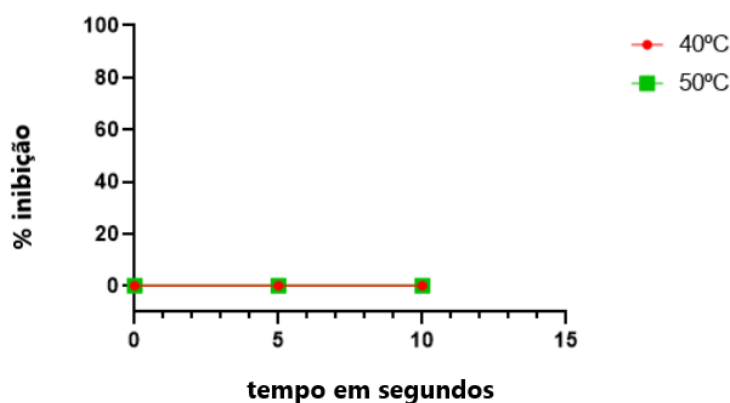
Essas descobertas são de suma importância para o avanço do conhecimento sobre a cinética do calor em relação ao VACV. Os resultados sugerem que a inativação térmica do VACV segue uma cinética semelhante à observada em outros OPXV, dada a similaridade entre eles. Essa compreensão é crucial não apenas para a eficácia dos protocolos de tratamento térmico na indústria de alimentos, mas também para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de infecções por OPXV em geral. Essas descobertas podem contribuir significativamente para a formulação de diretrizes de segurança alimentar e políticas de saúde pública relacionadas à manipulação e ao consumo de produtos lácteos em áreas endêmicas para OPXV.

Considerando os indivíduos que adquirem o leite cru, sem qualquer tratamento térmico em suas residências, buscamos avaliar o processo pelo qual esse leite é posteriormente consumido. Para isso, investigamos o método de processamento doméstico ao qual o leite é comumente submetido, o qual envolve o aquecimento até atingir a temperatura máxima de ebulição, que é de aproximadamente 60°C. Esse processo é frequentemente realizado em um

curto período de tempo, no qual o leite permanece nessa temperatura por alguns segundos até o desligamento do fogo utilizado para atingir esta temperatura. Com base nesse cenário doméstico típico, procuramos reproduzir esse procedimento com o leite experimentalmente infectado pelo VACV. Essa abordagem nos permitirá avaliar a eficácia desse método de tratamento térmico na inativação do VACV, fornecendo insights valiosos sobre a segurança do consumo de leite cru em ambientes domésticos.

Conforme evidenciado no gráfico, observamos que o leite submetido a temperaturas de 40°C e 50°C por períodos de 0, 5 e 10 segundos não apresentou redução na carga viral do VACV contida no leite. Esses resultados sugerem que essas condições de tratamento térmico não foram eficazes na inativação do vírus, o que tem implicações significativas para a segurança do consumo de leite cru em ambientes domésticos. Essa constatação destaca a importância de considerar cuidadosamente os métodos de processamento térmico ao lidar com leite cru e ressalta a necessidade de medidas preventivas adicionais para mitigar os riscos de transmissão do VACV no ambiente doméstico.

Figura 42 – Inativação térmica do VACV em diferentes temperaturas



Inativação térmica a 40°C e 50°C nos tempos 0, 5 e 10 segundos (103 PFU/ml). Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Dessa forma, podemos inferir que o processamento térmico doméstico ao qual o leite é comumente submetido, caracterizado por temperaturas abaixo de 62°C por curtos períodos de tempo, não é capaz de reduzir a carga viral do VACV se este estiver presente neste produto. Essa constatação é de extrema relevância, especialmente em áreas endêmicas de VB, onde o consumo de leite cru pode representar uma via de infecção significativa para a população.

4.5 Conclusão

Com os resultados experimentais deste trabalho sobre o processamento térmico do leite experimentalmente infectado pelo VACV podemos inferir que o VACV atua diretamente no que tange a segurança alimentar e a saúde pública. Os resultados obtidos indicam claramente que as temperaturas comuns de processamento doméstico, geralmente abaixo de 62°C e aplicadas por breves períodos de tempo, não são capazes de inativar eficazmente o VACV presente no leite. Isso é especialmente preocupante em áreas endêmicas de VB, onde o consumo de leite cru é comum e pode servir como uma importante via de transmissão do vírus para a população. Essas descobertas destacam a necessidade de revisão das práticas de segurança alimentar, bem como da implementação de medidas preventivas e educativas mais intensas para conter os riscos de infecção por VACV associados ao consumo de leite cru. Isso inclui a promoção de técnicas de pasteurização adequadas e a educação dos consumidores sobre os perigos potenciais do consumo de leite não processado termicamente. Além disso, ressalta-se a importância contínua da pesquisa nesse campo para desenvolver estratégias mais eficazes de controle e prevenção da disseminação do VACV. Em um contexto mais amplo, esta pesquisa destaca a interseção complexa entre a saúde animal, a segurança alimentar e a saúde humana. Ela ressalta a necessidade de uma abordagem holística e colaborativa para abordar os desafios enfrentados na proteção da saúde pública contra ameaças zoonóticas como o VACV. Somente por meio de esforços conjuntos entre cientistas, profissionais de saúde, autoridades regulatórias e comunidades locais podemos desenvolver estratégias eficazes para mitigar os riscos associados ao consumo de leite cru e os produtos derivados dele para proteger a saúde de todos os indivíduos em áreas endêmicas para a VB.

5 CAPÍTULO III – PROSPECÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ORTHOPOXVÍRUS EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DA REGIÃO NORTE DE MINAS GERAIS

5.1 Objetivos

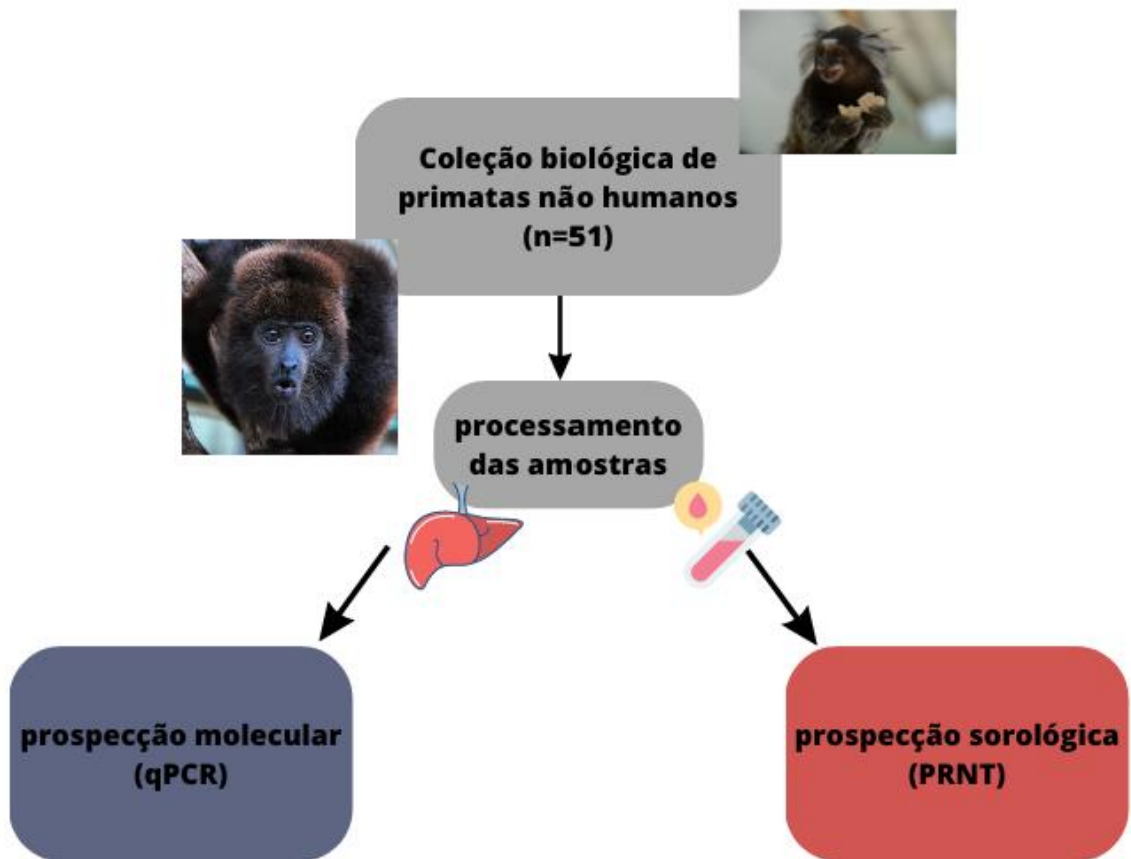
5.1.1 Objetivo geral

Prospectar OPXV em primatas não humanos na região norte de Minas Gerais.

5.1.2 Objetivos específicos

- Detectar anticorpos neutralizantes anti- OPXVs em primatas não humanos na região norte de Minas Gerais utilizando a técnica de PRNT;
- Detectar DNA de OPXVs em primatas não humanos do capturados em ambientes silvestres da região norte de Minas Gerais, utilizando qPCR para os genes C11R e A56R.

5.2 Fluxograma de trabalho



5.3 Materiais e métodos

5.3.1 Coleção de Primatas não humanos

Durante o trabalho, foram avaliadas amostras de 51 primatas neotropicais pertencentes a três espécies, sendo elas (*Callithrix penicillata* e *C. geoffroy* – Família *Callitrichidae*; e *Alouatta caraya* – Família *Atelidae*). Estas amostras foram provenientes de 11 municípios, espalhados pela porção região norte do estado de Minas Gerais, sendo eles: Salinas, Berizal, Araçuaí, Coronel Murta, Unaí, Arinos, Rio Pardo de Minas, Taiobeiras, Icaraí de Minas, Ubaí e Brasília de Minas.

As coletas foram realizadas entre os meses de julho de 2020 e janeiro de 2022 e todos os protocolos utilizados para as coletas de espécimes clínicos foram previamente aprovados pelo Comitê Institucional de Ética em Experimentação Animal (Protocolo CEUA/IFNMG nº14/2019) e pelo Ministério do Meio Ambiente (SISBIO nº 71714-2).

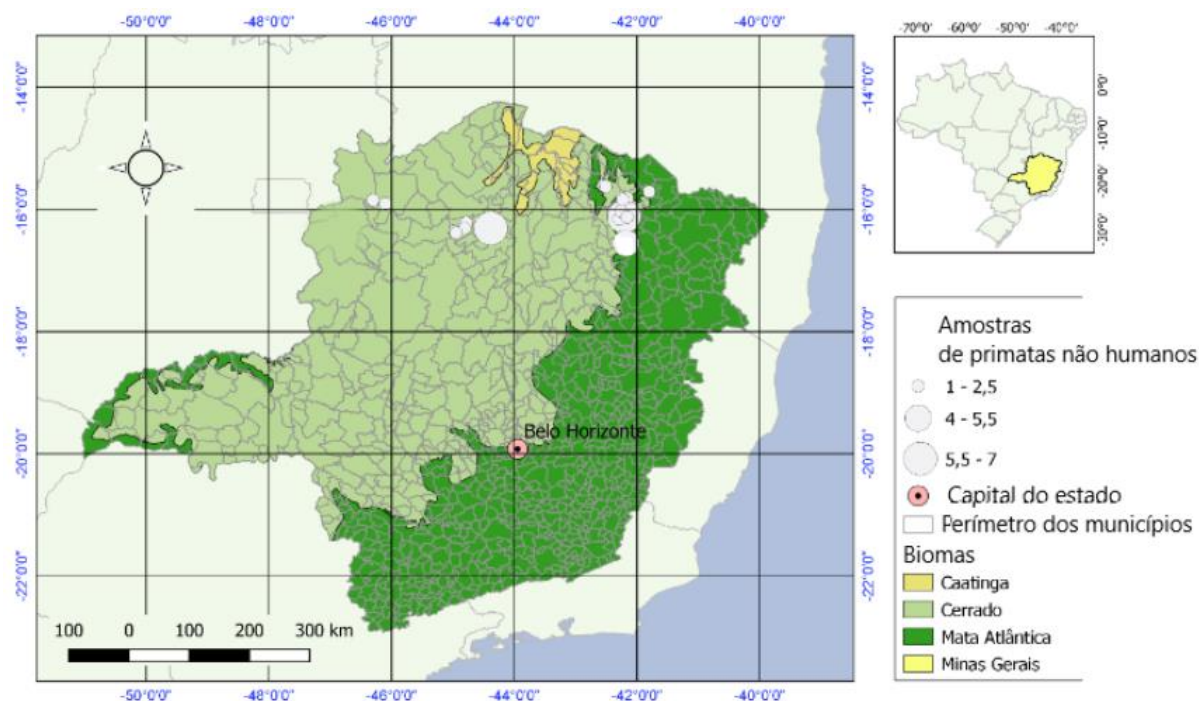
Dessa forma, os saguis de vida livre foram capturados com o auxílio de armadilhas do tipo Tomahawk e posteriormente analisados (Abreu et al. 2020). Também foram analisados saguis e bugios doentes ou mortos, quando encontrados por meio de uma rede de informações (De Abreu et al. 2019; Andrade et al. 2021).

Após a coleta de soro e/ou fígado, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente armazenadas em freezers a -80 graus até a realização dos ensaios moleculares e sorológicos.

5.3.2 Área de estudo

As amostras dos primatas não humanos deste estudo, foram obtidas através de coletas realizadas na região norte do estado de Minas Gerais, Brasil. Esta área está predominantemente dentro do bioma Cerrado, mas também podemos observar a presença de outros biomas sendo eles a Caatinga e a Mata Atlântica. Os pontos amostrais variaram de acordo com cada município amostrado, abrangendo áreas urbanas, rurais ou silvestres, como podem ser observados no mapa a seguir.

Figura 43 – Mapa indicando as áreas de estudo



Demonstração dos pontos amostrais e biomomas pertencentes à área de estudo realizados no estado de Minas Gerais, Brasil. A figura foi realizada utilizando o software QGIS, versão 3.10. Fonte Abreu et al., 2022.

5.3.3 Processamento das amostras de fígado

As amostras de fígado foram elencadas como órgão-alvo para a extração do material genético e diagnóstico de infecção por OPXV pela técnica molecular de qPCR. Para a realização do ensaio, as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e descongeladas em uma caixa de isopor com gelo, a fim de evitar perda do material e descongelamento abrupto. Uma porção de 25 mg do órgão selecionado foi seccionada com o auxílio de uma lâmina de bisturi, alocada em um novo microtubo de 1,5 mL do tipo *ependorf* e pesada em balança de precisão. Sequencialmente ocorreu a maceração da amostra, realizada após a adição de 200 uL de solução tampão fosfato salina – PBS (pH 7,2) com auxílio do aparelho *bead beater* pelo qual foram submetidas à maceração por 3 vezes por um período de 30' cada. Após este processamento inicial, as amostras foram submetidas ao procedimento de extração de DNA, utilizando o kit *DNA High Pure Viral Nucleic Acid Kit*, Roche, conforme orientações do fabricante.

5.3.4 Extração do DNA

A extração do DNA das amostras dos primatas ocorreu do mesmo modo das extrações descritas no item 5.11 do capítulo I.

5.3.5 Diluição das amostras de soro

As diluições das amostras de soro provenientes dos primatas não humanos ocorreram do mesmo modo das amostras citadas no item 5.12 presente no capítulo I.

5.3.6 PCR em tempo real

As amostras foram submetidas ao mesmo protocolo citado no item 5.13 do capítulo I.

5.3.7 Soroneutralização por redução de placa (PRNT)

A técnica aqui empregada ocorreu do mesmo modo citado anteriormente no item 5.15 presente no capítulo I.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Investigação da circulação de OPXV em primatas não humanos da região norte do estado de Minas Gerais

Para a realização da investigação da circulação de OPXV em primatas não humanos da região norte do estado, analisamos uma coleção de amostras cedidas pelo pesquisador Dr. Felipe Abreu do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Norte de Minas Gerais, IFNMG. As coletas das amostras foram realizadas entre os anos de 2020 e 2022. Durante o período do estudo foram capturados 51 primatas neotropicais pertencentes a três espécies, sendo elas: *Callithrix penicillata* e *Callithrix geoffroy* pertencentes à Família *Callitrichidae*; e *Alouatta caraya* pertencente à Família *Atelidae*. Dos animais capturados no estudo, foi possível realizar a coleta de soro dos animais capturados vivos, enquanto os animais encontrados já sem vida, as coletas compreenderam tanto soro quanto tecido hepático. A distribuição quantitativa dessas coletas, delimitada por município, bem como a tipologia das amostras obtidas e os resultados correspondentes, são apresentados de forma detalhada na tabela subsequente.

Tabela 17 – Descrição das amostras testadas por espécie, habitat, data, ponto de amostragem, alvo e cidade

ID	Espécie	Habitat	Data da coleta	Latitude	Longitude	Soro	Fígado	Cidade
MG10	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	04/07/2020	-16.120847	-42.209519	neg	-	
MG11	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	04/07/2020	-16.120847	-42.209519	neg	-	
MG12	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	04/07/2020	-16.120847	-42.209519	neg	-	
MG13	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	04/07/2020	-16.120847	-42.209519	neg	-	
MG25	<i>C. penicillata</i>	Urbano	19/09/2020	-16.160950	-42.293317	neg	-	Salinas
MG26	<i>C. penicillata</i>	Urbano	21/09/2020	-16.160950	-42.293317	neg	-	
MG62	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	13/04/2021	-16.026000	-42.266000	-	neg	
MG63	<i>C. penicillata</i>	Rural	13/04/2021	-16.157528	-42.311306	-	neg	
MG64	<i>C. penicillata</i>	Rural	24/07/2021	-16.157528	-42.311306	-	neg	
MG96	<i>C. penicillata</i>	Rural	17/02/2022	-16.15637	-42.30730	-	neg	
MG14	<i>C. penicillata</i>	Rural	30/07/2020	-15.711878	-41.800169	neg	-	Berizal
MG15	<i>C. penicillata</i>	Rural	30/07/2020	-15.711878	-41.800169	neg	-	
MG32	<i>C. geoffroyi</i>	Rural	18/10/2020	-16.12522	-42.159269	neg	-	Araçuaí

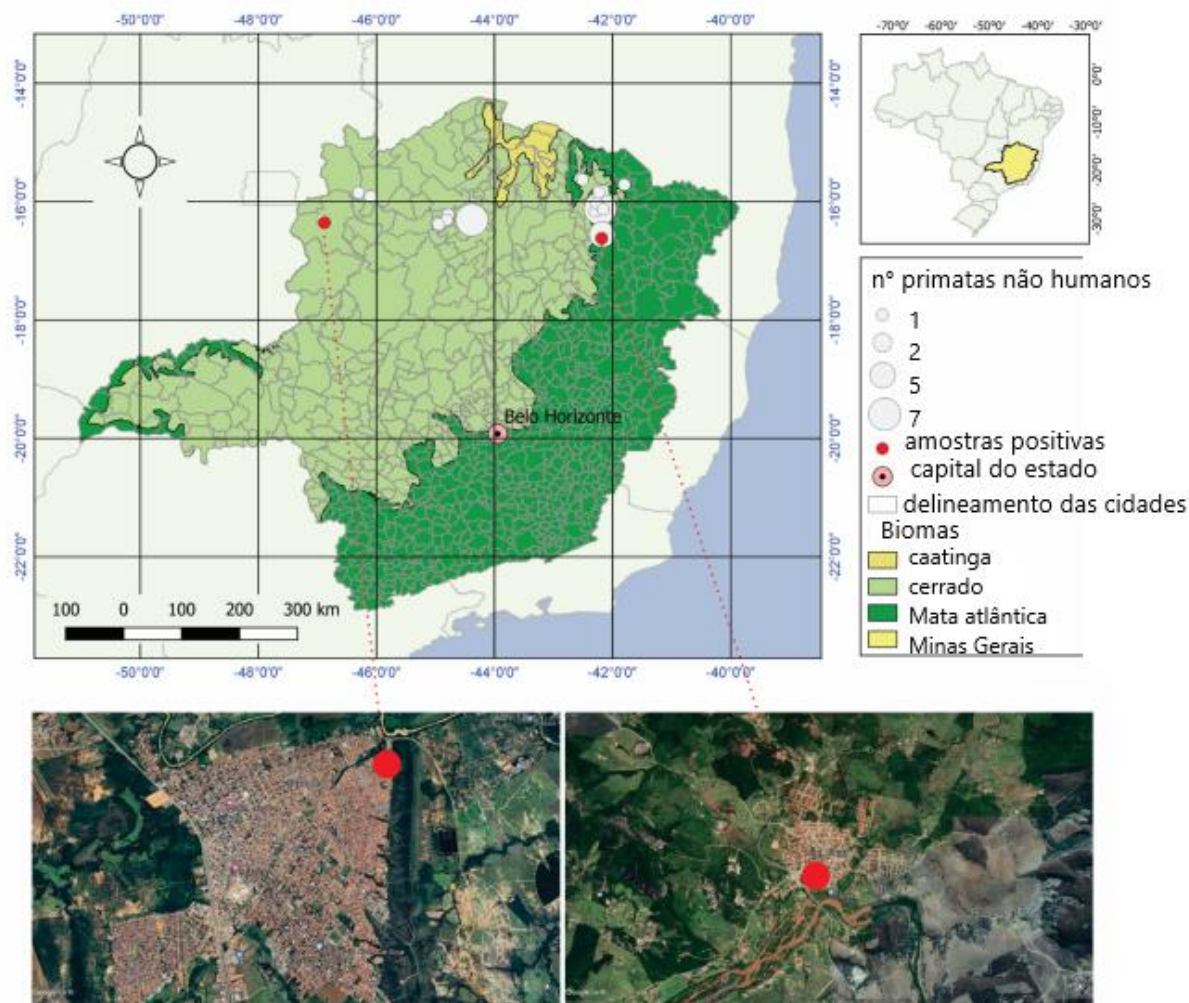
MG33	<i>C. penicillata</i>	Rural	19/10/2020	-16.553161	-42.176839	neg	-	
MG34	<i>C. penicillata</i>	Rural	19/10/2020	-16.553161	-42.176839	neg	-	
MG35	<i>C. penicillata</i>	Rural	20/10/2020	-16.553161	-42.176839	neg	-	Coronel Murta
MG36	<i>C. penicillata</i>	Rural	20/10/2020	-16.553161	-42.176839	neg	-	
MG38	<i>C. penicillata</i>	Rural	20/10/2020	-16.553161	-42.176839	neg	-	
MG39	<i>C. penicillata</i>	Urbano	21/10/2020	-16.619644	-42.183942	POS	-	
MG43	<i>C. penicillata</i>	Urbano	11/01/2021	-16.352694	-46.881139	neg	-	
MG45	<i>C. penicillata</i>	Urbano	11/01/2021	-16.352694	-46.881139	POS	-	
MG46	<i>C. penicillata</i>	Urbano	11/01/2021	-16.352694	-46.881139	neg	-	Unaí
MG48	<i>A. caraya</i>	Rural	17/01/2021	-16.308444	-46.907722	neg	-	
MG49	<i>A. caraya</i>	Rural	17/01/2021	-16.308445	-46.907723	neg	-	
MG50	<i>C. penicillata</i>	Rural	19/01/2021	-15.911472	-46.099972	neg	-	Arinos
MG51	<i>C. penicillata</i>	Rural	19/01/2021	-15.848770	-46.300809	neg	-	
MG52	<i>C. penicillata</i>	Urbano	20/03/2021	-15.609222	-42.542694	neg	-	
MG53	<i>C. penicillata</i>	Urbano	20/03/2021	-15.609222	-42.542694	neg	-	Rio Pardo de Minas
MG54	<i>C. penicillata</i>	Rural	20/03/2021	-15.629972	-42.508472	neg	-	
MG55	<i>C. penicillata</i>	Rural	20/03/2021	-15.629972	-42.508472	neg	-	
MG56	<i>C. penicillata</i>	Urbano	22/03/2021	-15.807389	-42.239111	neg	-	
MG57	<i>C. penicillata</i>	Urbano	22/03/2021	-15.807389	-42.239111	neg	-	
MG58	<i>C. penicillata</i>	Rural	23/03/2021	-15.817889	-42.159972	neg	-	Taiobeiras
MG59	<i>C. penicillata</i>	Rural	23/03/2021	-15.817889	-42.159972	neg	-	
MG60	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	24/03/2021	-15.841139	-42.229750	neg	-	
MG61	<i>C. penicillata</i>	Silvestre	24/03/2021	-15.841139	-42.229750	neg	-	
MG66	<i>A. caraya</i>	Silvestre	25/08/2021	-16.217389	-44.783694	-	neg	
MG72	<i>A. caraya</i>	Silvestre	13/09/2021	-16.340278	-44.947139	-	neg	Icaraí de Minas
MG73	<i>A. caraya</i>	Silvestre	13/09/2021	-16.356083	-44.965333	-	neg	
MG74	<i>A. caraya</i>	Silvestre	13/09/2021	-16.356083	-44.965333	-	neg	
MG68	<i>C. penicillata</i>	Rural	26/08/2021	-16.311667	-44.810000	-	neg	Ubaí
MG76	<i>A. caraya</i>	Silvestre	16/09/2021	-16.385444	-44.947083	-	neg	
MG75	<i>C. penicillata</i>	Rural	14/09/2021	-16.354417	-44.349639	-	neg	Brasília de Minas

MG77	<i>A. caraya</i>	Silvestre	20/11/2021	-16.32207	-44.42859	-	neg
MG80	<i>A. caraya</i>	Silvestre	18/01/2022	-16.309691	-44.382729	-	neg
MG81	<i>A. caraya</i>	Silvestre	18/01/2022	-16.309644	-44.382161	-	neg
MG82	<i>A. caraya</i>	Silvestre	17/01/2022	-16.309691	-44.382729	-	neg
MG83	<i>A. caraya</i>	Silvestre	17/01/2022	-16.309691	-44.382729	-	neg
MG84	<i>A. caraya</i>	Silvestre	17/01/2022	-16.309694	-44.382709	-	neg
MG85	<i>A. caraya</i>	Silvestre	17/01/2022	-16.309664	-44.382386	-	neg
MG89	<i>A. caraya</i>	Silvestre	19/01/2022	-16.306517	-44.383528	-	neg

(neg) negativo (POS) positivo. Soros testados molecularmente e sorologicamente. Fígados testados molecularmente. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Em nossas análises de soroneutralização pela técnica de PRNT, foi possível observar a presença de anticorpos anti-OPXV (mais de 50% de neutralização do ECP quando comparado ao controle de vírus) em dois primatas da espécie *Callithrix penicillata* (3,17%). Esses achados, nos mostram que esses animais PRNT positivos apresentaram uma exposição prévia a OPXV. Os pontos de amostragem em que estes animais positivos foram encontrados estavam separados por uma quilometragem de 505 quilômetros em linha reta, demonstrando a ampla distribuição geográfica de OPXV.

Figura 44 – Pontos amostrais dos animais positivos



Mapa indicando onde os animais positivos na PRNT do estudo foram capturados. O local de coleta das amostras positivas são demonstradas pelos pontos vermelhos. A figura foi realizada utilizando o software QGIS, versão 3.10. Fonte: Abreu et al., 2022.

A pesquisa sobre a presença de anticorpos anti-OPXV em primatas não humanos ainda é bastante limitada. Até recentemente, estudos ecológicos sugeriam que a circulação desses vírus em ambientes silvestres estava principalmente associada a roedores, considerados os reservatórios naturais de vírus como o CPXV e o vírus akhmeta. No entanto, a detecção de anticorpos anti-OPXV em primatas não humanos, como observado em nosso estudo, indica uma possível ampliação do espectro de hospedeiros desses vírus no ambiente silvestre. Isso ressalta a necessidade de uma investigação mais abrangente sobre a epidemiologia desses vírus em populações animais silvestres (CHANTREY *et al.*, 1999; SANDVIK *et al.*, 1998; DOTY *et al.*, 2019).

Igualmente como no nosso estudo, Abraão e colaboradores 2010 avaliaram a presença de anticorpos anti-OPXV em primatas não humanos em uma região silvestre no estado do

Tocantins. Na região de estudo, os animais analisados foram capturados em áreas de ambiente silvestre, presumivelmente sem contato com seres humanos e, teoricamente, sem exposição prévia a gado leiteiro, dadas as características das regiões de coleta. Em seus achados, estes pesquisadores encontraram uma alta soropositividade entre os primatas da espécie *C. apella*, sendo 68 dos 269 analisados soropositivos para OPXV, ou seja, 25,3% deles. A soroprevalência anti-OPXV foi ainda maior entre os animais *A. caraya* sendo 13 dos 27 animais dessa espécie soropositivos com base nos testes de PRNT.

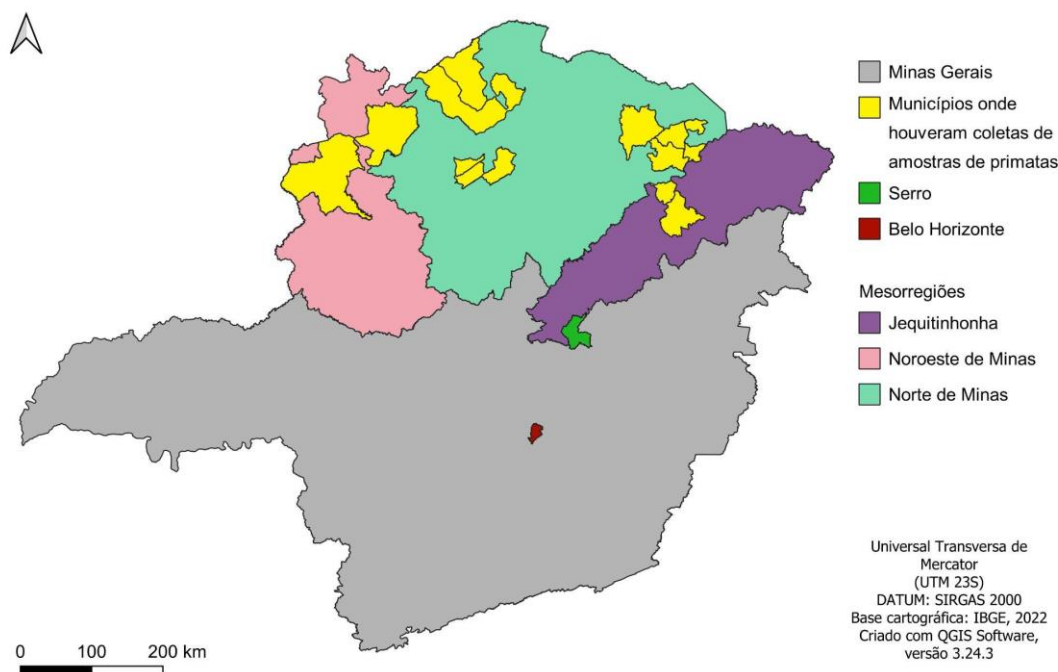
Devido à reatividade sorológica cruzada entre os OPXV e a inespecificidade do teste de PRNT, seria possível inferir que as amostras positivas deste estudo conduzido por Abraão e colaboradores em 2010 poderiam indicar a detecção de qualquer uma das 12 espécies de vírus pertencentes a este gênero atualmente. No entanto, é amplamente reconhecido, com base em numerosos estudos sobre OPXV, que se intensificaram principalmente após 2010, que o VACV é considerado endêmico no Brasil. Além disso, infecções por outros OPXV eram até o presente ano do estudo geograficamente restritas a outros continentes e não foram identificadas em nosso país até o ano de 2022, ano o qual foi registrado o primeiro caso de mpox no país. Essa distinção é importante para interpretar os resultados sorológicos e entender a epidemiologia dos OPXV no contexto brasileiro. Essa inferência pode ser feita de maneira ainda mais assertiva, quando falamos dos resultados encontrados em nosso estudo, já que inúmeros estudos já demonstraram a vasta circulação de VACV caracterizados filogeneticamente em surtos ocorridos na região sudeste do país e no estado de Minas Gerais como demonstrados por Trindade e colaboradores 2006 e Drumond e colaboradores 2008.

Em nossos resultados, os dois animais que apresentaram resultados positivos de anticorpos neutralizantes para OPXV foram coletados em áreas próximas ao perímetro urbano, destacando a proximidade desses animais com os seres humanos e animais domésticos. Esse achado era esperado, considerando a crescente interação entre humanos e animais, o que aumenta a probabilidade de propagação de zoonoses como a VB. Essa relação próxima entre humanos e animais urbanos ressalta a importância da vigilância e controle adequados para prevenir a disseminação de doenças zoonóticas nessas áreas. Isso porque essa íntima relação entre homens e animais faz com que os transbordamentos zoonóticos ocorram cada vez mais (DOS PASSOS; MARTINS, 2020).

Os primatas neotropicais de vida livre soropositivos encontrados em nosso estudo demonstram esse cenário, pois ambos foram capturados próximo ao ambiente urbano. Esses resultados, demonstram que esses animais transitam entre ambientes florestais e cidades, possibilitando eventos de transbordamento zoonótico (DOLJA; KOONIN, 2018). Vários vírus

ilustram essas rotas, como o vírus da febre amarela e o vírus do herpes. Mesmo assim, pouco se sabe sobre vários deles em circulação, como é o caso do VACV, originalmente descrito em bovinos no Brasil.

Figura 45 – pontos amostrais de captura



Demonstração dos locais onde os animais do estudo foram capturados e a sobreposição destes pontos com a mesorregião do Jequitinhonha. As regiões em amarelo indicam os locais de captura. A região em roxo, indica a mesorregião do Jequitinhonha, localidade onde ocorreu a coleta das amostras do capítulo I deste estudo. Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Na figura 45 é possível observarmos o mapa que representa as regiões em que os primatas não-humanos (PNH) foram capturados, assim como a mesorregião do Jequitinhonha, local onde está situado o município do Serro, região a qual foi realizado nosso estudo do capítulo I deste trabalho. Com este mapa, podemos inferir que a circulação de VACV já consolidada na região do Serro, pode ser mais amplamente distribuída do que o já demonstrado na literatura e que os animais silvestres como os PNH podem ser responsáveis por disseminar este vírus no ambiente silvestre.

De fato, estudos anteriores têm demonstrado que o VACV pode persistir em reservatórios animais silvestres, incluindo roedores e outros mamíferos, além de animais domésticos como gado, equinos, gatos e cães. Essa ampla gama de hospedeiros potenciais ressalta a importância da vigilância e do controle eficaz para prevenir a transmissão e a propagação do VACV entre diferentes populações animais e humanas (ABRAHÃO, 2010; COSTA et al. 2018; PERES et al. 2013). Esses achados fortalecem a noção de que algumas

espécies de roedores podem atuar como pontes entre habitats naturais e ambientes habitados por humanos e animais domésticos, facilitando a transmissão do vírus de animais silvestres para animais domésticos e vice-versa. Esse fenômeno destaca a importância da compreensão dos padrões de interação entre diferentes populações de animais selvagens e domésticos com o homem (ABRAHÃO *et al.*, 2009; MIRANDA *et al.* 2017).

5.4.2 Prospecção molecular de VACV em primatas não humanos da região norte do estado de Minas Gerais

Em nosso trabalho, todas as amostras de soro e fígado foram analisadas molecularmente por ensaios de PCR em tempo real. Como resultado destas análises, foi possível observar que todo o nosso número amostral, sendo ele constituído de amostras de fígado e soro dos animais capturados foram negativas através desta técnica. Esses achados demonstram que no momento em que as coletas foram realizadas os animais não apresentavam infecção ativa do VACV, contudo, com base nos dados sorológicos anteriormente demonstrados, é possível inferir que por mais que os animais analisados não apresentassem infecção aguda por VACV estes foram expostos previamente a algum OPXV. Embora a técnica sorológica utilizada no estudo não seja específica para o VACV e sim para o gênero OPXV de maneira ampla, é importante ressaltar que no Brasil não havia até a presente data de coleta das amostras, relatos documentados da circulação de outros OPXV além do VACV. O VACV é um OPXV considerado endêmico em algumas regiões, especialmente no estado de Minas Gerais. Portanto, os resultados positivos para anticorpos anti-OPXV obtidos neste estudo indicam fortemente a exposição dos animais a esse vírus específico, o VACV.

Curiosamente, este estudo marca a primeira identificação de evidências de exposição à OPXV em *Callithrix penicillata*. Essa espécie, conhecida por habitar a interface entre ambientes urbanos e florestais, é frequentemente avistada em diversas áreas urbanas brasileiras, onde mantém contato próximo com os seres humanos (NOGUEIRA *et al.*, 2014). Adicionalmente, a abrangência geográfica dos achados positivos indica que essa interação entre OPXV e *Callithrix* é amplamente disseminada por todo o território da região norte do estado de Minas Gerais. Essas descobertas representam uma contribuição significativa para a compreensão da dinâmica das interações entre primatas não humanos e vírus zoonóticos, além de destacar a importância da vigilância e do controle de doenças emergentes em ambientes urbanos e rurais.

Nesse contexto, torna-se imprescindível a realização de estudos sobre a circulação dos OPXV em primatas neotropicais de vida livre. Essa necessidade se torna ainda mais importante

nos dias atuais, com a introdução do MPXV em novas regiões do planeta e as potenciais consequências do possível estabelecimento de um ciclo zoonótico. A compreensão dos padrões de transmissão e interação entre esses vírus e os primatas não humanos é crucial para a previsão e prevenção de eventos de *spill-over* (transmissão de vírus de animais para humanos) e *spill-back* (transmissão de vírus de humanos para animais), destacando a importância da vigilância epidemiológica e do monitoramento contínuo da saúde das populações de primatas neotropicais e humanos (KOCK, 2014; GLIDDEN *et al.*, 2021).

5.5 Conclusão

A circulação do VACV em primatas não humanos é um tema de grande relevância para a compreensão da dinâmica das doenças zoonóticas e seu potencial impacto na saúde humana e na conservação da vida selvagem. Os resultados apresentados fornecem evidências significativas da exposição desses primatas ao VACV, revelando uma interação previamente desconhecida entre os primatas neotropicais de vida livre e esse agente patogênico. A detecção de anticorpos anti-OPXV em espécimes de primatas, como *Callithrix penicillata*, destaca a importância da realização de estudos adicionais para investigar a extensão e a natureza dessa interação. Além disso, esses achados ressaltam a necessidade de implementação de medidas de vigilância epidemiológica e de conservação, visando monitorar e controlar a disseminação do VACV em populações de primatas não humanos. Considerando o contexto atual de emergência de doenças zoonóticas, como a mpox, é crucial compreender os fatores que contribuem para a transmissão desses vírus entre animais e humanos. A pesquisa contínua sobre a circulação do VACV em primatas não humanos desempenha um papel fundamental na prevenção e no controle de surtos potenciais, bem como na proteção da saúde pública e da biodiversidade. Portanto, se torna imprescindível que esforços sejam direcionados para a realização de estudos interdisciplinares que abordem a ecologia, a epidemiologia, a fim de elucidar os mecanismos subjacentes à circulação do VACV em primatas não humanos e suas implicações para a saúde global.

REFERENCIAS

ABRAHÃO, J.S. Transmissão de Vaccinia virus em modelo murino: eliminação e resistência das partículas virais. 2008. nf. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

ABRAHÃO, J.S.; GUEDES, M.I.; TRINDADE, G.S. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? PLoS ONE, v.4, n.10, p.7428, 2009.

ABRAHÃO, J. S., SILVA-FERNANDES, A. T., LIMA, L. S., CAMPOS, R. K., GUEDES, M. I., COTA, M. M., BONJARDIM, C. A. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. Emerging infectious diseases, v. 16, n. 6, p. 976, 2010.

ALBARNAZ, J. D.; TORRES, A. A.; SMITH, G. L. Modulating Vaccinia Virus Immunomodulators to Improve Immunological Memory. Viruses, v. 10, n. 3, 1 30 mar. 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5869494/>. Acesso em: 27 abril 2023.

ALVES CARRARA, A. N. G. E. L. O., & GANDOLFI BENITES, F. R. Pecuária leiteira e comércio de queijos em Minas Gerais, séculos XVIII-XX. **Historia Agraria**, n. 89, 2023.

AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K.; CROTTY, S. Immunity and immunological memory following smallpox vaccination. Immunological Reviews, v. 211, p.320-337, 2006.

Andrade, M. S., Campos, F. S., de Oliveira, C. H., Oliveira, R. S., Campos, A. A., Almeida, M. A., Abreu, F. V. Fast surveillance response and genome sequencing reveal the circulation of a new Yellow Fever Virus sublineage in 2021, in Minas Gerais, Brazil. **bioRxiv**, p. 2021.11.24.469129, 2021.

Araújo, J. P. A., Camargo, A. C., Carvalho, A. F., & Nero, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1845-1860, 2020.

ASSIS, F., TRINDADE, G., DRUMOND, B., FRACE, M., SAMMONS, S., EMERSON, G., KROON, E. Genome Announcements, v. 4, n. 3, p. e00536-16, 2016.

ASSIS, F.L.; FRANCO-LUIZ, A.P.M.; PAIM, L.M. Horizontal study of Vaccinia virus infections in endemic area: epidemiologic, phylogenetic and economic aspects. Arch. Virol.,

v.160, p.2703-08, 2015.

ASSIS, F.L.; VINHOTE, W.M.; BARBOSA, J.D. et al. Reemergence of Vaccinia virus during zoonotic outbreak, Pará State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.19, n.12, p. 2017-20, 2013.

BARBOSA COSTA, G., SILVA DE OLIVEIRA, J., TOWNSEND, M. B., CARSON, W. C., BORGES, I. A., MCCOLLUM, A. M., DE SOUZA TRINDADE, G. Educational Approach to Prevent the Burden of Vaccinia Virus Infections in a Bovine Vaccinia Endemic Area in Brazil. *Pathogens*, v. 10, n. 5, p. 511, 2021.

BEDENHAM, G., KIRK, A., LUHANO, U., SHIELDS, A. The importance of biodiversity risks: Link to zoonotic diseases. *British Actuarial Journal*, v. 27, 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Instrução normativa no57. Brasília 16 de dezembro de 2011.

BRASIL. Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal.

Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jan. 2001.

BRASIL. 2013. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. Diário Oficial da União. Brasília, DF. Disponível em: <https://bit.ly/2TVYfHE>.

BORREMANS, B., FAUST, C., MANLOVE, K. R., SOKOLOW, S. H., LLOYD-SMITH, J. O. Cross-species pathogen spillover across ecosystem boundaries: mechanisms and theory. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 374, n. 1782, p. 20180344, 2019.

BORGES, I. A., MCCOLLUM, A. M., MEHAL, J. M., HABERLING, D., DUTRA, L. A. L., VIEIRA, F. N., TRINDADE, G. S. Dairy production practices and associated risks for bovine vaccinia exposure in cattle, Brazil. *New microbes and new infections*, v. 20, p. 43-50, 2017.

BRÜGGER, P. O apocalipse da pecuária: uma síntese caleidoscópica dos riscos e possibilidades de mudança. *Revista Brasileira de Direito Animal*; 13 (2), 2018.

BULLER, R. M. L.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiological Reviews*, v.55, n.1, p.80-122, 1991.

BUNGE, E. M., HOET, B., CHEN, L., LIENERT, F., WEIDENTHALER, H., BAER, L. R., STEFFEN, R. The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 16, n. 2, p. e0010141, 2022.

CAMPOS, G. Z., LACORTE, G. A., JURKIEWICZ, C., HOFFMANN, C., LANDGRAF, M., DE MELO FRANCO, B. D. G., PINTO, U. M. Microbiological characteristics of Canastra cheese during manufacturing and ripening. *Food Control*, v. 121, p. 107598, 2021.

CAMPOS, R.K.; BRUM, M.C.S.; NOGUEIRA, C.E.W. et al. Assessing the variability of Brazilian Vaccinia virus isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. *Arch. Virol.*, v.156, p.275–283, 2011.

CARGNELUTTI, J.F.; SCHMIDT, C.; MASUDA, E.K. et al., Vaccinia viruses isolated from cutaneous disease in horses are highly virulent for rabbits, *Microb. Pathog.*, v.52, n.3, p.192-199, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. Household transmission of vaccinia virus from contact with a military smallpox vaccinee--Illinois and Indiana, 2007. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 56, n. 19, p. 478-481, 2007.

CYRKLAKK, M.; RISCO, C. et al., Cryo-electron tomography of Vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005.

CONDIT, R. C., MOUSSATCHE, N., TRAKTMAN, P. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Advances in virus research*, v. 66, p. 31-124, 2006.

CONDIT, R. C., NILES, E. G. (2002). Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1577(2), 325- 36.

COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: Controle e Prevenção. *Boletim técnico*. n.º 93 -p. 1-30 ano 2012. Lavras –MG. Disponível em <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-93.pdf>>Acesso em:

março. 2022.

COSTA, G.B.; BORGES, I.A.; ALVES, P.A.; MIRANDA, J.B.; LUIZ, A.P.M.F.; FERREIRA, P.C.P.; ABRAHÃO, J.S.; MORENO, E.C.; KROON, E.G.; TRINDADE, G.S. Alternative Routes of Zoonotic Vaccinia Virus Transmission, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 21, No. 12, 2015.

COSTA, G.B.; AUGUSTO, L.T.S.; LEITE, J.A.; FERREIRA, P.C.P.; BONJARDIM, C.A.; ABRAHÃO, J.S.; KROON, E.G.; MORENO, E.C.; TRINDADE, G.S. Seroprevalence of Orthopoxvirus in rural Brazil: insights into anti-OPXV immunity status and its implications for emergent zoonotic OPXV. *Virology Journal* 13:121 DOI 10.1186/s12985-016-0575-6, 2016.

DAMASO, C.R.A.; Esposito, J.E.; Condit, R.C. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro state: Cantagalo virus may from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*, v.27,p.439-49, 2000.

DAMON, I. K.; DAVIDSON, W. B.; HUGHES, C. M.; et al. Evaluation of smallpox vaccines using variola neutralization. *Journal of General Virology*, v.90, p.1962-66, 2009.

DAMON, I. K. Poxviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. et al. (Eds). *Virology*. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p. 2160-2184.

D'ANUNCIAÇÃO, L., GUEDES, M. I. M., OLIVEIRA, T. L., REHFELD, I., BONJARDIM, C. A., FERREIRA, P. P., ABRAHÃO, J. S. Filling one more gap: experimental evidence of horizontal transmission of Vaccinia virus between bovines and rodents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 12, n. 1, p. 61-64, 2012.

DAS DORES, M. T., & FERREIRA, C. L. D. L. F. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2012.

DA SILVA, A.C.; REIS, B.B.; RICCI JUNIOR, J.E.R. et al. Human infection by the cowpoxvirus in the microregion of Itajuba, state of Minas Gerais: case report. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.41, n.5, p.507-11, 2008.

DA SILVA FILHO, J. V., FIGUEIRA, S. R. F. Mensuração do impacto de variáveis econômica sobre captação de leite no estado de Minas Gerais entre 1999 e 2016—uma análise utilizando modelo de cointegração. *Brazilian Journal of Development*, v. 5, n. 7, p. 10284-10300, 2019.

DE ABREU, F. V. S., DOS SANTOS, E., GOMES, M. Q., VARGAS, W. P., DE OLIVEIRA PASSOS, P. H., NUNES E SILVA, C., ... & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Capture of *Alouatta guariba clamitans* for the surveillance of sylvatic yellow fever and zoonotic malaria: Which is the best strategy in the tropical Atlantic Forest?. **American Journal of Primatology**, v. 81, n. 6, p. e23000, 2019.

DE AZEVEDO OLIVAL, A., SPEXOTO, A. A., DA FONSECA, L. F. L., & PINHEIRO, S. R. Programa educativo sobre qualidade do leite: aspectos culturais, sociais e tecnológicos. *Revista Ciência em Extensão*, v. 1, n. 1, p. 17-30, 2004.

DE FIGUEIREDO, A. P. G., PEREIRA, M. M., DA CUNHA, A. F., ALVES, J. R., & CERQUEIRA, M. M. O. P. Qualidade do leite de propriedades da área de proteção ambiental da bacia do córrego da velha no município de Luz (MG). *Ciência Equatorial*, v. 2, n. 2, 2012.

DE OLIVEIRA, J. S., COSTA, G. B., LUIZ, A. P. M. F., LEITE, J. A., BONJARDIM, C. A., ABRAHÃO, J. S., DE SOUZA TRINDADE, G. Cross-sectional study involving healthcare professionals in a Vaccinia virus endemic area. *Vaccine*, v. 35, n. 25, p. 3281-3285, 2017.

DE WIT, E., VAN DOREMALEN, N., FALZARANO, D., MUNSTER, V. J. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 8, p. 523-534, 2016.

CAMPOS, J. V. F., RESENDE, L. C., BASTOS, A. F., SILVA, M. O., ACURCIO, L. B. Pesquisa de *Staphylococcus* spp. em queijos “Minas Frescal” feitos a partir de leite cru e comercializados no município de Formiga-MG. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 13, p. 1-5, 2021.

DOCEUL, V.; HOLLINSHEAD, M.; VAN DER LINDEN, L et al. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*. v.327, n.87, p.873- 6, 2010.

DOS PASSOS, A. J.; MARTINS, V. Emergência De Zoonoses Transmitidas Por Animais Silvestres. *Anais do Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão, UNICRUZ: Cruz Alta*, p. 2-8, 2020.

DO VALE, B., LOPES, A. P., FONTES, M. D. C., SILVESTRE, M., CARDOSO, L., COELHO, A. C. A Cross-Sectional Study of Knowledge on Ownership, Zoonoses and Practices among Pet Owners in Northern Portugal. *Animals*, v. 11, n. 12, p. 3543, 2021.

DOMINGOS, I.J.S. et al. Twenty Years after Bovine Vaccinia in Brazil: Where We Are and Where Are We Going? *Pathogens*, v. 10, n. 4, p. 406, 31 mar. 2021.

DRUMOND, B. P.; LEITE, J. A.; FONSECA, C. A. et al. Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect.*, v.10, n.2, p.185- 197, 2008.

DURAFFOUR. S.; MEYER, H.; ANDREI, G. Camelpox virus. *Antiviral Res.* v.92, n.2, p.167-86, 2011.

DUTRA, L. A. L., DE FREITAS ALMEIDA, G. M., OLIVEIRA, G. P., ABRAHÃO, J. S., KROON, E. G., TRINDADE, G. D. S. Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. *Archives of virology*, v. 162, n. 2, p. 439-448, 2017.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. 2021.

EMATER. Caracterização da Região do Serro como produtora de queijo Minas artesanal. Serro, Minas Gerais, Brasil. 2002.

ESSBAUER, S.; MEYER, H.; PORSCH-OZCURUMEZ, M. et al. Long-lasting stability of VACV (OPXV) in food and environmental samples. *Zoon.Pub.Health*, 54(34): 118-124, 2007.

FAO e IDF. Guia de Boas Práticas na Pecuária de Leite. Produção e Saúde Animal Diretrizes 2013.

FENNER, Frank. Global eradication of smallpox. *Reviews of infectious diseases*, v. 4, n. 5, p. 916-930, 1982.

FENNER, F., WITTEK, R., DUMBELL, K. R. Nova York, NY: Academic Press; 1989. Os ortopoxvírus.

FENNER, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.24, p.123-33, 2000.

FERREIRA, C.L.L.F.; MOURA, K.R.P.; BOTINHON, L.; COELHO, A.A.; SCHILLER, O.R. Avaliação tecnológica de culturas lácticas nacionais – produção de queijo Minas. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 47, n. 279-281, p. 32-37, 1992.

FERREIRA, J. M. S.; ABRAHÃO, J. S.; DRUMOND, B. P. et al., Vaccinia virus: shedding and horizontal transmission in a murine model. *J. Gen. Virol.*, v.89, t.12, 2986-2991, 2008.

FONSECA, C. D. Arraiais e vilas d'el rei: espaço e poder nas Minas setecentistas. Editora Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 2011.

FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.

GLEDHILL, A. W. Latent Ectromelia. *Nature*, v. 196, p. 298, 1962.

GLIDDEN, C. K., NOVA, N., KAIN, M. P., LAGERSTROM, K. M., SKINNER, E. B., MANDLE, L., MORDECAI, E. A. Human-mediated impacts on biodiversity and the consequences for zoonotic disease spillover. *Current Biology*, v. 31, n. 19, p. R1342-R1361, 2021.

GREEN, S. The Bioeconomics of Domesticating Zoonoses. *Cultural Anthropology*, v. 37, n. 1, p. 30–36-30–36, 2022.

GUERRA, A. F. *Microbiologia Geral. Biossegurança em Laboratórios de Microbiologia de Alimentos: Valença, 1ª Edição*, 2017.

GUIMARÃES, CARLOS MAGNO; REIS, FLÁVIA MARIA DA MATA. In: RESENDE, Maria Efigênia Lage de; VILALTA, Luiz Carlos. *As Minas Setecentistas, Volume 1*. Belo Horizonte: Autêntica, 2007, p. 321 – 336.

GUO, Z. S., LU, B., GUO, Z., GIEHL, E., FEIST, M., DAI, E., BARTLETT, D. L. Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *Journal for immunotherapy of cancer*, v. 7, n. 1, p. 1-21, 2019.

HAENSSLE, H. A., KIESSLING, J., KEMPF, V. A., FUCHS, T., NEUMANN, C., & EMMERT, S. Orthopoxvirus infection transmitted by a domestic cat. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 54, n. 2, p. S1-S4, 2006.

HAMMARLUND, E.; LEWIS, M. W.; HANSEN, S. G.; et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine*, v.9, n.9, p.1131-37, 2003.

HARPER, G.J. Airborne micro-organisms: survival tests with four viruses. *J. Hyg.*, v.59, n.8,

p.479-86, 1961.

HOCHMAN, G. Vacinação, varíola e uma cultura da imunização no Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(2):375-386, 2011.

HUTSON, C.L.; OLSON, V.A.; CARROLL, D.S. et al. A prairie dog animal model of systemic orthopoxvirus disease using West African and Congo Basin strains of monkeypox virus. *J Gen Virol.* v.90, n.2, p.323-33, 2009.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de pesquisas, dpe. Coordenação de população e indicadores sociais, 2018.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Poxviridae. Poxviridae - dsDNA Viruses - dsDNA Viruses (2011) – ICTV. Disponível em:

<https://ictv.global/report_9th/dsDNA/poxviridae>. Acesso em: 27 mar. 2023.

ICTV Management (2022). 00.058. Poxviridae. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Buchen-Osmond, C. (Ed), Columbia University, New York, USA

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV, 2022. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE- acesso em 21/03/2022- <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21121-primeiros-resultados-2leite.html?=&t=o-que-e>

JACOBS, B. L.; LANGLAND, J. O.; KIBLER, K. V.; et al. Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and Future. *Antiviral Research*, v.84, n.1, p.1-13, 2009.

HUGH-JONES, M. E., HUBBERT, W. T., HAGSTAD, H. V. Zoonoses: recognition, control, and prevention. John Wiley & Sons, 2008.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, v. 451, 12 n. 7181, p. 990–993, 21 fev. 2008.

JONES, B. A., GRACE, D., KOCK, R., ALONSO, S., RUSHTON, J., SAID, M. Y., PFEIFFER, D. U. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 21, p. 8399-8404, 2013.

KENNEDY, R. B.; OVSYANNIKOVA, I. G.; PANKRATZ, V. S.; VIERKANT, R. A.; JACOBSON, R. M.; RYAN, M. A. K.; et al. Gender effects on humoral immune responses to smallpox vaccine. *Vaccine*, v.27, n.25-26, p.3319-3323, 2009.

KING, Andrew MQ et al. (Ed.). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2012.

KOCK, Richard. Drivers of disease emergence and spread: is wildlife to blame?: proceedings. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, v. 81, n. 2, p. 1-4, 2014.

KROON, E. G.; MOTA, B. E. F.; ABRAHÃO, J. S.; FONSECA, F. G.; TRINDADE, G. S. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. *Antiviral Research*, v.92, p.150-63, 2011.

LEMOS, M. B., GALINARI, R., CAMPOS, B., BIASI, E.; SANTOS, F. Tecnologia, especialização regional e produtividade: um estudo da pecuária leiteira em Minas Gerais. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v. 41, n. 3, p. 117-138, 2003.

LEITE, J. A., DRUMOND, B. P., TRINDADE, G. S., LOBATO, Z. I., DA FONSECA, F. G., DOS SANTOS, J. R., KROON, E. G. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, p.1935-38, 2005.

LEWIS-JONES, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 17, p. 81-89, 2004.

LIMA, M. T., OLIVEIRA, G. P., ASSIS, F. L., DE OLIVEIRA, D. B., VAZ, S. M., DE SOUZA TRINDADE, G., KROON, E. G. Ocular vaccinia infection in dairy worker, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 24, n. 1, p. 161, 2018.

LIU, L., COOPER, T., HOWLEY, P. M., HAYBALL, J. D. From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses*, v. 6, n. 10, p. 3787-3808, 2014.

LOBATO, Z.I.P.; TRINDADE, G.S.; MADUREIRA, M.C.et al. Surto de variola bovina causada por virus vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.4, p.423-429, 2005.

LOUSBERG EL, DIENER KR, BROWN MP, HAYBALL JD. Innate immune recognition of poxviral vaccine vectors. *Expert Rev Vaccines*. v.10, n.10, p.1435-49, 2011.

LUSTIG, S., MAIK-RACHLINE, G., PARAN, N., MELAMED, S., ISRAELY, T., EREZ, N., SHAFFERMAN, A. Effective post-exposure protection against lethal orthopoxviruses infection by vaccinia immune globulin involves induction of adaptive immune response. *Vaccine*, v. 27, n. 11, p. 1691-1699, 2009.

MAIBORODA A.D. Experimental infection of Norwegian rats (*Rattus norvegicus*) with ratpox virus. *Acta Virol.* v.2, n.65, p.106-9, 1982.

MADUREIRA, M.C. Vaccinia bovina no Estado de Minas Gerais, 2005-2007. 2009,102f. Tese (Doutorado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTINS, E. Patrimônio de Minas. *Rev. Econ. Jornal Estado de Minas*, n.44, p. 14- 17, dez 2001.

MARTINA, B. E., VAN DOORNUM, G., DORRESTEIN, G. M., NIESTERS, H. G., STITTELAAR, K. J., WOLTERS, M. A., OSTERHAUS, A. D. Cowpox virus transmission from rats to monkeys, the Netherlands. *Emerging infectious diseases*, v. 12, n. 6, p. 1005, 2006.

MATOS, A.C.D. et al. Bovine Vaccinia: Insights into the Disease in Cattle. *Viruses*, 10, 120; 2018.

MCFADDEN, G. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol*, v3, n3, p. 201-213, 2005.

MCSWEENEY, P. L., OTTOGALLI, G., FOX, P. F. Diversity and classification of cheese varieties: an overview. *Cheese*, p. 781-808, 2017.

MEDAGLIA, M. L. G.. Genomic Analysis, Phenotype, and Virulence of the 32 Historical Brazilian Smallpox Vaccine Strain IOC: Implications for the Origins and Evolutionary Relationships of Vaccinia Virus. *Journal of Virology*, v. 89, n. 23, p. 34 11909–11925, dez. 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.01833-15> . Acesso em: 17 maio 2022.

MEDEIROS-SILVA, D.C.; MOREIRA-SILVA, E.A.S.; GOMES, J.A.S. et al. Clinical signs, diagnosis and reports of Vaccinia virus infections. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.14, n.2, p.129-134, 2010.

MEGID, J.; APPOLINÁRIO, C.M.; LANGONI,H. et al. Vaccinia virus in humans and cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.79, n.5, p.647-51,

2008.

MENESES, José Newton Coelho de (2000). O continente rústico: Abastecimento alimentar nas Minas Gerais setecentistas. Diamantina: Maria Fumaça.

MILK POINT. Programa Leite Legal capacitará 15 mil produtores às normas da IN62. Milk Point, 26 ago. 2013. Disponível em:

<<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/programa-leite-legal-capacitara-15-mil-produtores-mineiros-as-normas-da-in-62-85254n.aspx>>. Acesso em 20 fev. 2022.

MILLER, L.; RICHTER, M.; HAPKE, C.; et al. Genomic Expression Libraries for the Identification of Cross-Reactive Orthopoxvirus Antigens. PLoS ONE, v.6, n.7, e21950, 2011.

MMA. Biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/noticias/noticia-acom-2018-04-2964>. Acesso em: 18 de maio de 2022.

MONTEIRO, R. P., & Da Matta, V. M. Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Livro técnico (INFOTECA-E), 2018.

MORENS, D. M., FAUCI, A. S. Emerging pandemic diseases: how we got to COVID-19. Cell, v. 182, n. 5, p. 1077-1092, 2020.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, 5 ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 2905–2945, 2007.

MOSS, B. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. Immunology Reviews, v.239, n.1, p.8-26, 2011.

MOSS, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B. N., et al. (Eds). Virology. 6.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2013. p.2129-2159.

MOTA, B. E. F.; TRINDADE, G. S.; DINIZ, T. C.; SILVA-NUNES, M.; BRAGA, E. M.; URBANO-FERREIRA, M.; et al. Seroprevalence of orthopoxvirus in an Amazonian rural village, Acre, Brazil. Archives of Virology, v.155, p.1139-44, 2010.

NAGASSE-SUGAHARA, T.K.; KISIELIUS, J.J.; UEDA-ITO, M. et al. Human vaccinia-like

virus outbreaks in São Paulo and Goiás States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.46, p.315-322, 2005.

NASCIMENTO, R. S., ROSALIN, J. P., & DE PAULA ISMAEL, V. Os Elementos da Produção de Queijo Minas Artesanal na Região da Serra da Canastra (MG): Paisagem e Território na Perspectiva da Geografia Cultural. *Revista Georaguaia*, v. 11, n. 1, p. 278-293, 2021.

NETTO, M. M. A Geografia do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Edição do Autor, 2014. p.429.

NOGUEIRA, M., SANTOS, D., HENRIQUES, M., DUARTE, L., & YOUNG, R. J. Behavioural and ecological aspects of black tufted-ear marmosets, *Callithrix penicillata* (Geoffroy, 1812)(Primates: Callitrichidae) in a semi-urban environment. *Revista de Etologia*, v. 13, 2014.

OLIVAL, K. J., HOSSEINI, P. R., ZAMBRANA-TORRELIO, C., ROSS, N., BOGICH, T. L., DASZAK, P. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature*, v. 546, n. 7660, p. 646-650, 2017.

OLIVEIRA, D.B.; ASSIS, F.L.; FERREIRA, P.C.P. et al. Short report: Group 1 *Vaccinia* virus zoonotic outbreak in Maranhão State, Brazil. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, v.89, n.6, p.1142-45, 2013.

OLIVEIRA, G., ASSIS, F., ALMEIDA, G., ALBARNAZ, J., LIMA, M., ANDRADE, A. C., ABRAHÃO, J. From lesions to viral clones: Biological and molecular diversity amongst autochthonous Brazilian *Vaccinia* virus. *Viruses*, v. 7, n. 3, p. 1218–1237, 2015.

OLIVEIRA, J. S. D., FIGUEIREDO, P. D. O., COSTA, G. B., ASSIS, F. L. D., DRUMOND, B. P., DA FONSECA, F. G. TRINDADE, G. D. S. *Vaccinia* virus natural infections in Brazil: the good, the bad, and the ugly. *Viruses*, v. 9, n. 11, p. 340, 2017.

OLIVEIRA, T.M.; REHFELD, I.S.; SIQUEIRA, J.M. et al. *Vaccinia* virus is not inactivated after thermal treatment and cheese production using experimentally contaminated milk. *Foodborne Path. Dis.*, v.7, n.12, p.1491–96, 2010.

PAIM, C.; ALONSO, W. *Pandemia, saúde global e escolhas pessoais*. Alfenas: Cria Editora, 2020.

PERES, M. G., BACCHIEGA, T. S., APPOLINÁRIO, C. M., VICENTE, A. F.,

ALLENDORF, S. D., ANTUNES, J. M. A. P., MEGID, J. Serological study of vaccinia virus reservoirs in areas with and without official reports of outbreaks in cattle and humans in São Paulo, Brazil. *Archives of Virology*, v. 158, n. 12, p. 2433-2441, 2013.

PERES, M.G.; BARROS, C.B.; APOLINÁRIO, C.M. et al. Dogs and Opossums positive for Vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.22, n.2, 2016.

PEROBELLI, F.S.; ARAÚJO-JUNIOR, I.F.; CASTRO, L.S.; et al., As dimensões espaciais da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais. *Nova Economia*, v.28 n.1 p.297-337, 2018.

Petersen, B. W., Harms, T. J., Reynolds, M. G., & Harrison, L. H. Use of vaccinia virus smallpox vaccine in laboratory and health care personnel at risk for occupational exposure to orthopoxviruses—recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 10, p. 257-262, 2016.

PLOWRIGHT, R. K., REASER, J. K., LOCKE, H., WOODLEY, S. J., PATZ, J. A., BECKER, D. J., TABOR, G. M. Land use-induced spillover: a call to action to safeguard environmental, animal, and human health. *The Lancet Planetary Health*, v. 5, n. 4, p. e237-e245, 2021.

PRICHARD, M. N., KERN, E. R. Orthopoxvirus targets for the development of new antiviral agents. *Antiviral research*, v. 94, n. 2, p. 111-125, 2012.

PUTZ, MM, ALBERINI I, MIDGLEY CM, MANINI I, MONTOMOLI E, SMITH GL. Prevalence of antibodies to Vaccinia virus after smallpox vaccination in Italy. *J Gen Virol.*; v.86, p.2955–2960, 2005.

RABELO, A. M.; OLIVEIRA, D. B. Impactos ambientais antrópicos e o surgimento de pandemias. *Unifesspa: Painel Reflexão em tempos de crise*; 26, 2020.

REHFELD, I. S. Transmissão de vaccinia virus pelo leite em modelo murino; detecção e viabilidade de poxivírus no queijo e leite. 2016.

REHFELD, I. S., FRAIHA, A. L. S., MATOS, A. C. D., GUEDES, M. I. M., COSTA, E. A., DE SOUZA, M. R., LOBATO, Z. I. Survival of Vaccinia virus in inoculated cheeses during 60-day ripening. *Journal of dairy science*, v. 100, n. 9, p. 7051-7054, 2017.

RHEINBABEN, F. V., GEBEL, J., EXNER, M., SCHMIDT, A. Environmental resistance,

disinfection, and sterilization of poxviruses. In: Poxviruses. Birkhäuser Basel, 2007. p. 397-405.

RIZK, J. G., LIPPI, G., HENRY, B. M., FORTHAL, D. N., & RIZK, Y. Prevention and treatment of monkeypox. **Drugs**, v. 82, n. 9, p. 957-963, 2022.

ROBERTS, K.L.; SMITH, J.C. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Cell press: trends in microbiology*, v.33, n.10, p.472-479, 2008.

SANTOS , M. V. Controle da mastite ambiental. *Mundo do Leite*, São Paulo, a. 10, n. 56, ago./set. p. 16-21, 2012.

SCHATZMAYR, H.G.; COSTA, R.V.C.; GONÇALVES, M.C.R. et al. Human infections caused by vaccinia-like poxviruses in Brazil [in portuguese]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.42, n.6, p.672-6, 2009.

SEET, B. T. et al. Poxviruses and immune evasion. *Annual Review of Immunology*, v. 21, p. 377-423, 2003.

SERTÃO BRÁS. Sindicato de Produtores de Serro.2017a. Disponível em: <https://www.sertaobras.org.br/2017/03/20/sindicato-dos-produtores-de-serro/> (acesso em março, 2022).

SERTÃO BRÁS. História dos queijos artesanais no Brasil. 2017. Disponível em: <https://www.sertaobras.org.br/2017/08/31/um-pouco-da-historia-da-producao-e-da-cura-de-queijos-artesanais-no-brasil/> (acesso em março, 2022).

SILVA, N. I. O. et al. Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses*, v. 13, n. 43, p. 20,30 dez. 2021.

SMITH, G. L.; VANDERPLASSCHEN, A., LAW M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*, v.83, p.2915-31, 2002.

SMITH, G.; MCFADDEN, G. Smallpox: Anything To Declare?. *Nature Reviews Immunology*, V.2, P. 521-7, 2002.

SMITH, G. L.; MURPHY, B. J., LAW, M. Vaccinia virus motility. *Annual Review of Microbiology*, v. 28, n 3, p. 149-185. 2002b.

SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Immune Response to Poxvirus Infections in Various Animals. *Critical Reviews in Microbiology*, v.28, n.3, p.149-185, 2002.

SILVA-FERNANDES, A.T.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; FERREIRA, J.M.S.F. et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J.Clin. Virol.*, v.44, n.4, p.308-13, 2009.

SINGH, R. K., BALAMURUGAN, V., BHANUPRAKASH, V., VENKATESAN, G., HOSAMANI, M. Emergence and reemergence of vaccinia-like viruses: global scenario and perspectives. *Indian Journal of Virology*, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2012.

SOUZA, A. R. V.; LUQUES, M. N.; DAMASO, C. R. Genomic diversity of vaccinia virus strain cantagalo isolated in southeastern Brazil during the early years of the outbreak, 1999-2006. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 115, n. 12, p. 1-5, 1 dez. 2020.

TRINDADE, G.S.; DRUMOND, B.P.; GUEDES, M.I.M.C. et al. Zoonotic Vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin. Infect. Dis.*, v.48, n.3, p.37-40, 2009.

TRINDADE, G.S.; FONSECA, F.G.; MARQUES, J.T. et al. Araçatuba virus: a Vaccinia like virus associated with Infection in humans and cattle. *Emerg. Infect. Dis.*, v.9, n.2, p.1-9, 2003.

TRINDADE, G.S.; LOBATO, Z.I.P.; DRUMOND, B.P. et al. Short Report: isolation of two Vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.75, n.3, p.486-90, 2006.

TRINDADE, G. S. et al. Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 7, p. 965-972, 2007.

UNEP. Megadiverse Brazil: giving biodiversity an online boost. United Nations Environment Programme, 2019. Disponível em: <https://www.unep.org/news-and-stories/story/megadiverse-brazil-giving-biodiversity-online-boost> Acesso em: 27 de abril de 2023.

VANDERPLASSCHEN, A., HOLLINSHEAD, M., SMITH, G. L. Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *Journal of General Virology*, v. 79, n. 4, p. 877-887, 1998.

WALLACE, G.D.; BULLER, R.M. Kinetics of Ectromelia virus (mousepox) transmission and clinical response in C57BL/6j, BALB/cByj and AKR/J inbred mice. *Lab Anim Sci.* v.35, n.1, p.41-46, 1985.

WHO. Connecting Global Priorities: Biodiversity and Human Health. A State of Knowledge Review. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. World Health Organization and Secretariat of the Convention on Biological Diversity, 2015.

WOOD, J. P., CHOI, Y. W., WENDLING, M. Q., ROGERS, J. V., CHAPPIE, D. J. Environmental persistence of vaccinia virus on materials. *Letters in applied microbiology*, v. 57, n. 5, p. 399-404, 2013.

XU, R.; JOHNSON, A. J.; LIGGITT, D.; et al. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *The Journal of Immunology*, v.172, p.6265-71, 2004.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Questionário epidemiológico



Projeto:
AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DO VACV EM PROPRIEDADES DA REGIÃO DO SERRO-MG: MEDIDAS PARA MINIMIZAR O IMPACTO DO VIRUS VACCÍNIA NA ECONOMIA LEITEIRA DA REGIÃO.

Data da Investigação: ____/____/____

Ficha nº: _____

1. DADOS PESSOAIS

Nome: _____

Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____

Profissão: _____

Escolaridade: 1) Analfabeto (); 2) 1º incompleto (); 3) 1º completo (); 4) 2º incompleto (); 5) 2º completo (); 6) superior incompleto (); 7) superior completo (); 8) pós-graduado ().

Como você classifica sua cor/etnia? 1. Branco (); 2. Preto (); 3. Pardo (); 4. Amarelo (); 5. Indígena ().

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

1. Até 1 salário (); 2. Até 2 salários (); 3. De 2 a 3 salários (); 4. De 3 a 4 salários (); 5. Acima de 4 salários (); 6. Ignorado ().

2. DADOS CLÍNICOS-EPIDEMIOLÓGICOS

1. Contato com animais domésticos? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

2. Manejo e ordenha de gado 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

3. Presença de animais com alguma lesão? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

4. Contato com animais silvestres? 1. Sim () 2. Não () Quais: _____

5. Presença de roedores na casa/propriedade? 1. Sim () 2. Não ()

6. Caso a propriedade tenha roedores, onde estes animais são normalmente vistos? 1. Dentro de casa () 2. Quintal () Outros _____

7. Faz Controle de Ratos: 1. Sim () 2. Não ()

Caso sim, como e com qual periodicidade: _____

8. Já ouviu falar da Vaccínia Bovina? 1. Sim () 2. Não ()

9. Como ficou conhecendo a doença? 1. Ocorrência de surto (); 2. Rádio (); 3. TV (); 4. Outro proprietário (); 5. Técnico (); 6. Jornal ou revista (); 7. Internet (); 8. Outro meio _____

10. Já ocorreu surto de Vaccínia Bovina na propriedade? 1. Sim (); Não () Quando? _____

11. Teve a Vaccínia Bovina? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()

12. Se sim, quais sintomas apresentou? 1. Febre (); 2. Cefaléia (); 3. Mialgia (); 4. Conjuntivite (); 5. Dor abdominal (); 6. Calafrios (); 7. Vômitos (); 8. Linfadenopatia (); 9. Náuseas (); 10. Icterícia (); 11. Lesões disseminadas (); Outros _____

13. Ocorrência de lesões visíveis? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()

Local da lesão: _____

Duração (dias): _____

14. Tipo da lesão: 1. Pápula (); 2. Vesícula (); 3. Pústula (); 4. Úlcera (); 5. Eritema periférico (); 6. Infecção bacteriana (); Mais lesões: _____

15. Presença de cicatriz? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()
Onde: 1. Mãos (); 2. Braço (); 3. Antebraço (); 4. Face (); 5. Pernas (); 6. Outra () _____

16. Mais alguém na propriedade adoeceu? 1. Sim (); 2. Não ()
Se sim, em que regiões do corpo apareceram lesões características? 1. Mãos (); 2. Braço (); 3. Antebraço (); 4. Face (); 5. Boca (); 6. Pernas (); 7. Outras _____

3. ANTECEDENTE VACINAL

1. Vacinado para a varíola? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()
2. Marca vacinal no braço esquerdo? 1. Sim () 2. Não () 9. Ignorado ()

4. CONSUMO E MANIPULAÇÃO DE LEITE

1. O leite é usado na alimentação familiar? 1. Sim (); 2. Não ()
2. Qual a origem do leite consumido? 1. Próprio (); 2. Industrial (); 3. Propriedade rural do município (); 4. outra _____
3. O leite é fervido? 1. Sim (); 2. Não ()
4. Há consumo de leite cru? 1. Sim (); 2. Não ()
5. Se sim, com qual frequência? 1. Diariamente (); 2. Semanalmente (); 3. Mensalmente (); 4. Anualmente ()
6. Realiza a manipulação do leite cru para produção de queijo ou derivados? 1. Sim (); 2. Não ()
7. Durante a manipulação do leite para a produção de queijo e derivados faz uso de luvas ou algum equipamento de proteção individual?
1 () Luvas 2 () outros equipamentos, quais? _____
8. Os produtos são comercializados? Sim (); 2. Não ()
9. Realiza ordenha? 1. Sim (); 2. Não ()
10. Tipo de ordenha: 1. Manual (); 2. Mecânica ()
11. Número de ordenhas por dia: 1 (); 2 (); 3 (); mais _____
12. Onde o leite é armazenado após a ordenha? 1. Latão (); 2. Tanque de expansão ()
13. O leite produzido na propriedade é distribuído? 1. Sim (); 2. Não () Se sim, para onde? _____
14. Utiliza algum produto para a desinfecção das mãos durante a ordenha? 1. Sim (); 2. Não ()
Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha (); 2. Entre vacas (); 3. Após a ordenha ()
15. Utiliza algum produto para a desinfecção dos tetos durante a ordenha? 1. Sim (); 2. Não ()
Se sim, em qual momento? 1. Antes da ordenha (); 2. Depois da Ordenha ()

5. DADOS SOBRE A PROPRIEDADE

1. Qual a dimensão da propriedade? _____
2. Qual o número de animais do rebanho? _____

3. Qual o número de animais em ordenha? _____
4. Com o leite e seus derivados são comercializados? 1. através da cooperativa () 2. Diretamente nos estabelecimentos comerciais () 3. Outros meios () quais? _____
5. Qual a produção diária e mensal? _____
6. Qual a produção de queijo fresco? _____ E maturado? _____ qual período de maturação? _____
7. Quantos cães há na propriedade? _____
8. Quantos gatos há na propriedade? _____
9. Quantos equinos? _____
10. Esses animais já adoeceram? _____ se sim, quais os sintomas? _____

6. CONHECIMENTOS SOBRE VACCÍNIA

1. Já ocorreu surto de Vaccínia Bovina em sua propriedade? 1. Sim () Não () Quando? _____
2. Recebeu algum treinamento a respeito da doença? 1. Sim () 2. Não ()
Tipo de treinamento: _____
3. Quais os possíveis meios de contaminação e transmissão que levam ao surgimento da doença? 1. Contato com bovinos (); 2. Contato com equídeos (); 3. Contato com outros animais (); 4. Contato com animais silvestres (); 5. Contato com um indivíduo infectado (); 6. Consumo de leite cru (); 7. Consumo de queijo cru (); 8. Não sabe ()
4. Quais os sinais que podem ser associados a esta infecção? 1. Febre (); 2. Cefaleia (); 3. Mialgia (); 4. Conjuntivite (); 5. Dor abdominal (); 6. Calafrios (); 7. Vômitos (); 8. Linfadenopatia (); 9. Náuseas (); 10. Icterícia (); 11. Lesões disseminadas (); 12. Não sabe (); 13. Outros _____
5. Quais as principais formas de tratamento para esta doença? 1. Não há tratamento específico (); 2. Tratamento contra a dor (); 3. Tratamento contra infecções secundárias (); 4. Não sabe ()
6. Quais são as possíveis medidas preventivas para esta infecção? 1. Isolamento do trabalhador doente (); 3. Uso de equipamentos de proteção (); 3. Uso de desinfetantes (); 4. Limpeza periódica do ambiente de trabalho ()

7. DADOS NUTRICIONAIS E CONSUMO ALIMENTAR

1. Peso _____
2. Altura _____
3. IMC (kg/m²) _____
4. Você variou muito de peso nos últimos 6 meses? () SIM () NÃO
Se sim, quanto? _____
5. É portador de diabetes mellitus?
6. É portador de alguma outra doença? (ex: infecto-contagiosas ou de hipersensibilidade)
7. Faz uso de algum medicamento? Quais? _____
8. Quantas refeições realiza por dia? _____

9. Quais alimentos geralmente consome e em qual quantidade:

No café da manhã _____
Almoço _____
Lanche da tarde _____
Jantar _____
Ceia _____

8. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS ARBOVIROSES

1. Você tem contato com animais silvestres (macacos: micos, saguis, outros)?

1. Não ()

2. Sim () Quais: _____

3. Ignorado ()

2. Frequenta ambiente de mata? Ou realiza atividades de ecoturismo?

1. Não ()

2. Sim ()

3. Ignorado ()

3. Você frequenta propriedades rurais (fazendas/sítios)?

1. Não ()

2. Sim ()

3. Ignorado ()

4. Você já viu macacos próximos à sua propriedade ou aos locais de mata que frequenta?

1. Não ()

2. Sim ()

3. Ignorado ()

5. Foi vacinado contra Febre Amarela?

1. Não ()

2. Sim () Quantas vezes? _____ Data da última vacinação: ____/____/____

3. Ignorado ()

6. Você já teve Febre Amarela?

1. Não ()

2. Sim () Quando? _____ Quais foram os sintomas? _____

3. Ignorado ()

7. Você já teve Dengue?

1. Não ()

2. Sim () Quando? _____ Quais foram os sintomas? _____

3. Ignorado ()

8. Você já teve Zika?

1. Não ()

2. Sim () Quando? _____ Quais foram os sintomas? _____

3. Ignorado ()

9. Na sua casa/propriedade é comum a presença de mosquitos/pernilongos?

1. Não ()

2. Sim () () Apenas durante os meses mais chuvosos do ano () Durante todo ano

3. Ignorado ()

10. Na sua casa/propriedade você tem o hábito de verificar água parada em objetos no quintal?

1. Não ()

2. Sim ()

3. Ignorado ()

11. Você tem hábito de consumir bebidas alcoólicas?

1. Não ()

2. Sim () () Uma vez na semana () Até 2 vezes por semana () Entre 3 e 4 vezes por semana () Todos os dias

3. Ignorado ()

12. Você fuma?

1. Não ()

2. Sim () () Uma vez na semana () Até 2 vezes por semana () Entre 3 e 4 vezes por semana () Todos os dias

3. Ignorado ()

13. Você sofre de alguma doença crônica?

1. Não ()
2. Sim () **Qual?** _____
3. Ignorado ()

9. PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: ___/___/___

APÊNDICE 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Projeto: Avaliação da circulação do VACV em propriedades da região do Serro-MG: medidas para minimizar o impacto do vírus vaccinia na economia leiteira da região..

(de acordo com Resolução Nº466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012)

Você está sendo convidado pelo nosso grupo a participar de uma pesquisa que tem como finalidade de avaliar a circulação do Vaccinia vírus na região do Serro, assim como promover medidas para minimizar o impacto deste vírus na economia leiteira da região. Assim, gostaríamos de convidá-lo a participar como voluntário de um estudo que nos auxiliará a compreender melhor a circulação do vírus na região, ajudando-nos promover medidas educativas para melhorar a produção e inocuidade dos produtos da região.

Muitas viroses emergentes estão associadas a animais, devido ao contato direto entre o homem e animais domésticos. Eventualmente, pessoas que têm um contato direto com animais, sejam eles infectados ou não, apresentam grandes possibilidades de adquirir doenças, entre elas as doenças causadas por vírus. Muitas dessas doenças causam prostração, febre, inchaço dos membros superiores, dor e surgimento de pústulas e ferimentos nos membros superiores e inferiores. Geralmente, as doenças causadas por alguns vírus são benignas e a cura espontânea ocorre em pouco tempo. Em pessoas com o sistema imunológico comprometido as doenças podem ser mais graves. Atualmente, já se sabe que a produção de anticorpos contra os vírus é muito importante para a recuperação dos indivíduos que são afetados.

Você está sendo convidado a participar como voluntário. Caso aceite, você responderá a um questionário simples, sobre suas atividades de rotina, seu estado de saúde, conhecimentos sobre o vírus Vaccinia e estado nutricional. Os indivíduos doentes e também aqueles que moram na mesma região e que concordarem em participar do estudo será realizado um exame de sangue. Esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Esses são os mesmos efeitos que qualquer exame de sangue pode causar. Todos os testes serão acompanhados por profissional habilitado e medidas para diminuir os problemas citados serão realizadas. Serão retirados 10 ml de sangue, a mesma quantidade usada para exames de rotina (glicose, hemograma). Todo material utilizado é estéril e descartável, portanto isento de risco de contaminação. Serão utilizadas seringas descartáveis individuais para cada paciente. Todo material utilizado será destruído em frente ao paciente. Todos os exames a serem realizados serão gratuitos e os resultados serão enviados gratuitamente aos pacientes doadores. Além disso, será coletada uma amostra de swab oral, e swab de lesões cutâneas, se presentes.

Sua participação neste estudo possibilitará maior conhecimento sobre algumas viroses emergentes que podem circular em ambientes rurais no Brasil. Este estudo não acarretará em nenhum benefício imediato para o participante. No entanto, com o andamento do projeto, todo e qualquer achado que possa ser aplicado e revertido em benefício público será imediatamente implementado. O conhecimento gerado a partir de sua participação ajudará a se entender melhor como nosso organismo responde à infecção, ou porque algumas pessoas apresentam diferentes manifestações clínicas de uma mesma doença. Também auxiliará os profissionais de saúde a se prepararem de forma eficiente para o surgimento de novos surtos e poderá indicar se existe resposta imune humoral contra diversos vírus testados.

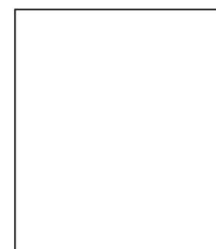
Para a realização deste projeto, os pesquisadores o submeteram ao Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto completo está disponível para que todo e qualquer participante possa ter conhecimento. Caso queira conhecer o projeto com mais detalhes, basta solicitar uma cópia à Doutoranda Kamila Rocha através do telefone (38) 988016291 ou (38) 999856680, ou através da autoridade de saúde

pública local. Você tem a liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo. A pesquisa será realizada no Laboratório de Vírus, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade, e em nenhum momento usaremos seu nome. Desta forma, as identidades serão preservadas. Esclarecemos também que ao participar desta pesquisa você poderá não ter nenhum benefício direto, assim como não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Entretanto, esperamos que este estudo nos forneça informações importantes sobre a presença de diversos vírus na região, de forma que possamos contribuir para evitar infecções futuras.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

Termo de consentimento livre após esclarecimento	
<p>Eu, _____</p> <p>li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo.</p> <p>Assim sendo, concordo em participar do estudo.</p> <p>Local: _____ Data: ____/____/____</p>	
<p>_____ Assinatura do voluntário</p>	<p>Nome: Identidade: Telefone pessoal: Telefone para contato: Nome do contato:</p>
<p>_____ Giliane de Souza Trindade Pesquisador responsável</p>	<p>Telefones para contato: (31) 3409-3002 Telefone do COEP: (31) 3409-4592</p>



Marca do polegar

APÊNDICE 3 - Laudos entregues aos produtores



**Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infecciosas e Parasitárias (LADIP)**

Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000
Alto da Jacuba
Diamantina/MG
CEP 39100-000 Telefone: 55 xx (38) 3532-1200/ 3532-6800

Identificação da Fazenda: Maravilha

Método: soroneutralização por redução de placa (PRNT) para Vaccinia Virus (VACV)

Animais: bovinos

Material: soro

Identificação do animal	resultado
2582	positivo
1876	positivo
2019	positivo
242	positivo
298	positivo
2386	positivo
2322	positivo
2171	positivo
1876	positivo
Fortaleza	positivo
Riane	positivo
Realeza	positivo

Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Diamantina, 05 de maio de 2021.



Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infeciosas e Parasitárias (LADIP)



Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000
Alto da Jacuba
Diamantina/MG
CEP 39100-000 Telefone: 55 xx (38) 3532-1200/ 3532-6800

Identificação da Fazenda: Maravilha

Método: soroneutralização por redução de placa (PRNT) para Vaccinia Vírus (VACV)

Animais: cães

Material: soro

Identificação do animal	resultado
Bolão	positivo
Stali	positivo
Rabito	positivo

Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Diamantina, 05 de maio de 2021.

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infeciosas e Parasitárias (LADIP)



Identificação da Fazenda: Amilton

Método: Plaque Reduction Neutralization Tests (PRNT) para Orthopoxvirus¹

Animais: bovinos adultos

Material: Soro

Data da Coleta: agosto/2021

Identificação do animal	resultado
144	positivo
214	positivo
273	positivo
34	positivo
208	positivo
203	negativo
282	positivo
219	positivo
141	positivo
272	positivo
207	positivo
222	positivo
215	positivo
149	positivo
210	positivo
146	positivo
medalha	positivo
gemada	positivo
xitinha	positivo
branquinha	positivo
143	positivo

Interpretação dos resultados:

- 1- As amostras são consideradas positivas quando o soro do animal é capaz de reduzir número médio de placas do ensaio em 50%.
- 2- Resultados positivos indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra Orthopoxvirus nos animais;

Prof^o Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Farmacêutico – Bioquímico

1

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde – CIPq- Saúde
Tel.: (38) 3532-1200 ramal 9055
Campus JK - Diamantina/MG
Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5.000
Alto da Jacuba CEP 39100-000 Diamantina - MG

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infeciosas e Parasitárias (LADIP)



Diamantina, 05 de maio de 2021

Identificação da Fazenda: Amilton

Método: Plaque Reduction Neutralization Tests (PRNT) para Orthopoxvirus²

Animais: bovinos jovens e cães

Material: Soro

Data da Coleta: agosto/2021

Identificação do animal	resultado
chamosa	positivo
brasília	positivo
mansinha	positivo
princesa	positivo
revista	positivo
medalha	negativo
borboleta	positivo
serenata	positivo
51	positivo
princesa	positivo
azeitona	positivo
portuguesa	positivo
moeda	positivo
57	positivo
roxinha	positivo
pintura	positivo
filhote cachorro	negativo
Sasha cachorro	positivo

Obs: Todos os animais acima correspondem aos bezerros das vacas cujos nomes se encontram na tabela, com exceção aos 2 cachorros identificados.

Interpretação dos resultados:

- 3- As amostras são consideradas positivas quando o soro do animal é capaz de reduzir número médio de placas do ensaio em 50%.
- 4- Resultados positivos indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra Orthopoxvirus nos animais

Prof^o Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Farmacêutico – Bioquímico
Diamantina, 05 de novembro de 2021

2

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Centro Integrado de Pesquisa e Pós-Graduação em Saúde – CIPq- Saúde
Tel.: (38) 3532-1200 ramal 9055
Campus JK - Diamantina/MG
Rodovia MGT 367 - Km 583, nº 5.000
Alto da Jacuba CEP 39100-000 Diamantina - MG

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infeciosas e Parasitárias (LADIP)



Identificação da Fazenda: Chokito

Método: Plaque Reduction Neutralization Tests (PRNT) para Orthopoxvirus¹

Animais: bovinos

Material: Soro

Data da Coleta: agosto/2021

Identificação do animal	resultado
beija-flor	positivo
espanhola	positivo
susana	positivo
roseira	positivo
codorna	positivo
usquadra	positivo
mansinha	positivo
maguinha	positivo
escrava	positivo
memória	positivo
roxona	positivo
lembrança	positivo
fernanda	positivo
roxalina	positivo
gaivota	positivo
rondonia	positivo
roxinha	positivo
rainha	positivo
boneca	positivo
craúna	positivo
sorocaba	positivo
dorotéia	positivo
pintura	positivo

Interpretação dos resultados:

- 1- As amostras são consideradas positivas quando o soro do animal é capaz de reduzir o número médio de placas do ensaio em 50%.
- 2- Resultados positivos indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra Orthopoxvirus nos animais;

Prof. Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Farmacêutico – Bioquímico
Diamantina, 05 de novembro de 2021

¹ . Natural Vaccinia virus infection: Diagnosis, isolation, and characterization. Curr. Protoc. Microbiol.



**Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infeciosas e Parasitárias (LADIP)**

Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000
Alto da Jacuba
Diamantina/MG
CEP 39100-000 Telefone: 55 xx (38) 3532-1200/ 3532-6800

Identificação da Fazenda: Ferreira Campos

Método: Plaque Reduction Neutralization Tests (PRNT) para Orthopoxvirus¹

Animais: bovinos

Material: Soro

Data da Coleta: 16/02/2021

Identificação do animal	resultado
Pintura	positivo
Famosa	positivo
Vitória	positivo
Waldo	positivo
Kamila	positivo
Lara	positivo
Bainha	positivo

Interpretação dos resultados:

- 1- As amostras são consideradas positivas quando o soro do animal é capaz de reduzir número médio de placas do ensaio em 50%.
- 2- Resultados positivos indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra Orthopoxvirus nos animais;

Profº Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Farmacêutico – Bioquímico
Diamantina, 05 de maio de 2021



**Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de doenças Infecciosas e Parasitárias (LADIP)**

Rodovia MGT 367 – Km 583, nº 5000
Alto da Jacuba
Diamantina/MG
CEP 39100-000 Telefone: 55 xx (38) 3532-1200/ 3532-6800

Identificação da Fazenda: Ferreira Campos

Método: Plaque Reduction Neutralization Tests (PRNT) para Orthopoxvirus²

Animais: cães

Material: Soro

Data da Coleta: 16/02/2021

Identificação do animal	resultado
Dara	positivo
Atena	positivo
Mel	positivo

Interpretação dos resultados:

- 3- As amostras são consideradas positivas quando o soro do animal é capaz de reduzir número médio de placas do ensaio em 50%.
- 4- Resultados positivos indicam a presença de anticorpos neutralizantes contra Orthopoxvirus nos animais;

*Profº Dr. Danilo Bretas de Oliveira
Farmacêutico – Bioquímico
Diamantina, 05 de maio de 2021*